

ВЛИЯНИЕ *WOLBACHIA* НА МОРФОЛОГИЮ И РЯД АСПЕКТОВ ИММУНИТЕТА ХОЗЯИНА *HABROBRACON HEBETOR* (SAY)

© 2025 г. Е. А. Черткова*, @, А. А. Алексеев*, **, А. П. Лобанова*,
К. А. Золотарева*, Н. А. Крюкова*

*Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091 Россия

**Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН,

ул. Институтская, 3, Новосибирск, 630090 Россия

@e-mail: chertkaterina@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.01.2024 г.

После доработки 24.04.2024 г.

После доработки 24.04.2024 г.

Проведен анализ двух линий паразитоида *Habrobracon hebetor*: зараженной эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* и свободной от нее. Отмечены различия морфологических признаков линий, а именно степени меланизации кутикулы и размеров тела имаго паразитоида. Размеры как самцов, так и самок достоверно больше у линии, зараженной бактерией. Установлено, что *Wolbachia* влияет на уровень дофамина, тирозина, активность фенолоксидаз и количество пролина в гомогенате целого тела разных стадий развития паразитоида.

Ключевые слова: эктопаразитоид, *Wolbachia*, фенолоксидазы

DOI: 10.31857/S1026347025010057

Habrobracon hebetor (Say) – широко распространенный эктопаразитоид, используемый для биологического контроля численности насекомых – вредителей сельского хозяйства, особенно *Pyralidae* и *Noctuidae* (Rafiee-Dastjerdi *et al.*, 2008; Исмаилов и др., 2020). Несмотря на то что *H. hebetor* широко используется для борьбы с вредителями сельского хозяйства и массово культивируется в лабораторных условиях, многие аспекты его физиологии и иммунитета все еще слабо изучены. Подробно исследованы различные аспекты применения *H. hebetor* в биоконтроле, в том числе в сочетании с инсектицидами и энтомопатогенными микроорганизмами (Saber, Abedi 2013; Sedaratian *et al.*, 2014; Исмаилов и др., 2020). Работы, направленные на изучение паразито-хозяиных отношений, где *H. hebetor* выступает в роли хозяина, малочисленны.

В 2010 году у *H. hebetor* впервые было зафиксировано присутствие эндосимбионта *Wolbachia* (Kageyama *et al.*, 2010). Основные исследования, направленные на изучение взаимодействий эндосимбионтов и паразитоидов, преимущественно посвящены изменениям в механизмах регуляции репродуктивного поведения и формированию такой репродуктивной аномалии, как цитоплазматическая несовместимость (Bagheri *et al.*, 2019).

По разным оценкам, от 20 до 76% видов членистоногих инфицировано *Wolbachia* (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Weinert *et al.*, 2015). Длительная коэволюция *Wolbachia* с беспозвоночными в качестве эндосимбионта привела к формированию ряда адаптаций, способствующих взаимовыгодному существованию хозяина и бактерии. Показано, что *Wolbachia* может влиять на продолжительность жизни, плодовитость, фертильность (Bi, Wang, 2020), а также способна изменять чувствительность хозяина к бактериям, вирусам, энтомопатогенным грибам, протозойным инфекциям и инсектицидам (Moreira *et al.*, 2009; Landmann *et al.*, 2010, 2012; Pietri *et al.*, 2016; Zélé *et al.*, 2020; Varotto-Boccazzì *et al.*, 2020; Pimentel *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). В ряде исследований показано, что *Wolbachia* является активатором врожденного иммунитета путем регуляции таких механизмов иммунитета, как синтез активированных форм кислорода (АФК), антимикробных белков и пептидов, а также белков-активаторов аутофагии (Thomas *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2012; Rancès *et al.*, 2012; Zug, Hammerstein, 2015; Leitner *et al.*, 2022).

Одним из важнейших механизмов иммунной системы насекомых, участвующем в защите от патогенов, заживлении ран, формировании гранул и капсул, является фенолоксидазный каскад, приводящий к синтезу меланина (Lavine, Strand 2003;

Kanost, Gorman, 2008; Cerenius, Söderhäll, 2021). Фенолоксидазы (ФО) играют важную роль в процессах линьки насекомых (Wang *et al.*, 2013), процессах распознавания свой—чужой, фагоцитозе, что делает их одним из ключевых звеньев иммунной системы насекомых. В организме насекомых ФО находятся в виде неактивных проферментов, профенолоксидаз (проФО) и локализуются в кутикуле, лимфе и гемоцитах, и только при нарушении целостности покровов и/или проникновении инородных тел (вирусов, бактерий, грибов) происходит их активация (Ashida, Brey, 1995; Koracek *et al.*, 1995; Sugumaran, 2002). Поскольку в процессе синтеза меланина образуются хиноновые промежуточные соединения, токсичные как для хозяина, так и для паразита, активация ФО-каскада строго регламентирована и локализована. ФО катализируют многие ступени каскада, включая превращение тирозина в 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), ДОФА в дофахром, которые затем могут быть использованы либо для меланизации и/или склеротизации (Huang *et al.*, 2005). Декарбоксилирование ДОФА с помощью ДОФА декарбоксилазы приводит образованию дофамина. Помимо участия в ФО-каскаде, дофамин является важным звеном, задействованным во многих физиологических процессах, в том числе как нейромедиатор, нейромодулятор и нейрогормон (Gruntenko *et al.*, 2017).

На фоне активного изучения влияния *Wolbachia* на уровень дофамина и, как следствие, на поведение, качество сна, продолжительность жизни и т.д (Gruntenko *et al.*, 2017) практически отсутствуют исследования, изучающие роль дофамина в иммунных реакциях при взаимодействии насекомых с эндосимбионтами (или в системе насекомое—эндосимбионт).

Существует множество исследований, связанных биохимические изменения у насекомых и феномен влияния *Wolbachia* на их устойчивость к вирусным и бактериальным инфекциям (Teixeira *et al.*, 2008; Hedges *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2017; Carrington *et al.*, 2018). Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе взаимодействия *Wolbachia* с хозяином, а также физиологические механизмы, с помощью которых *Wolbachia* способствует устойчивости хозяина, остаются в значительной степени неизвестными. Несмотря на очевидную связь, влияние *Wolbachia* на активность фенолоксидаз и уровень дофамина изучалось в достаточно немногочисленных, разрозненных работах. В частности, в работе Томаса с соавт. (Thomas *et al.*, 2011) было показано влияние *Wolbachia* на уровень дофамина и активность ФО у *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* и *Aedes aegypti*. Следует отметить, что в данном исследовании было показано, что разница в меланизации между инфицированными и неинфицированными

насекомыми не связана с уровнями дофамина (Thomas *et al.*, 2011). В работах, посвященных изучению влияния *Wolbachia* на формирование устойчивости комаров *Anopheles gambiae* к малярийному плазмодию, было показано, что бактерия блокирует развитие плазмодиев в клетках хозяина, активируя процессы меланизации и инкапсуляции (Kumar *et al.*, 2003; Walker, Moreira, 2011; Bian *et al.*, 2013). Работ, демонстрирующих изменения в количестве дофамина у паразитоидов под влиянием эндосимбионта *Wolbachia*, в зависимости от стадии развития хозяина, насколько нам известно, не проводилось.

В связи с тем, что *Wolbachia* не содержит полного набора метаболических путей, которыми обладают свободноживущие бактерии, ее выживание полностью зависит от организма хозяина (Wu *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2019). В частности, *Wolbachia* может использовать только ограниченное количество субстратов и способна синтезировать лишь часть промежуточных продуктов метаболизма. Считающаяся аминокислотным гетеротрофом, *Wolbachia* получает большую часть своей энергии, импортируя аминокислоты, такие как пролин, непосредственно от хозяина (Evans *et al.*, 2009). Пролин — важнейшая аминокислота, выполняющая важную роль в процессах энергетического обеспечения полета и детоксикации аммиака у насекомых (Scaraffia, Wells, 2003; Scaraffia *et al.*, 2005). Данная аминокислота имеет решающее значение для синтеза белка и роста клеток, в осморегуляции, регуляции стабильности белков, участвует в клеточной биоэнергетике (Bursell, 1981; Kempf, Bremer, 1998; Kumar *et al.*, 1998; Ignatova, Giersch, 2006; Wood, 2011; Moses *et al.*, 2012; Natarajan *et al.*, 2012).

Цель нашего исследования состояла в том, чтобы выявить взаимосвязь между наличием/отсутствием эндосимбионта *Wolbachia* у эктопаразитоида *H. hebetor* и активностью фенолоксидаз, содержанием дофамина, тирозина и пролина на разных стадиях развития паразитоида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Насекомые

Исследования проводили на разных стадиях развития двух линий *H. hebetor* (Biologische Begrattung, Берлин, Германия), зараженных *Wolbachia* (*w*⁺) и свободных от *Wolbachia* (*w*⁻). В качестве насекомого-хозяина для *H. hebetor* использовали гусениц воцинной огневки *Galleria mellonella*. Имаго эктопаразитоида содержали при 28 °C и фотографии 14/10 часов, на 12%-ном медовом сиропе (Крюкова *et al.*, 2011). В качестве хозяина для линочного поколения паразитоида использовали

личинок 4–5 возраста *Galleria mellonella* лабораторной линии ИСиЭЖ СО РАН. Линия, свободная от эндосимбиотической бактерии (w^-), была получена при инъектировании хозяина (*G. mellonella*) макроциклическим антибиотиком рифампицин (RUPE Belmedpreparaty, Беларусь), обладающим активностью против нескольких видов *Mycobacterium* (Sensi, 1983). Через три поколения была получена чистая линия, и далее паразитоиды содержали на гусеницах без обработки антибиотиком. Чистоту линии проверяли каждые 6 месяцев. Наличие или отсутствие *Wolbachia* у паразитоида контролировали с помощью ПЦР-анализа гомогенатов взрослых особей (как самцов, так и самок). Линии культивировали в лаборатории на протяжении четырех лет. Исследования проводили на личинках пятого возраста, фарматных имаго и имаго *H. hebetor*.

Оценка окраски кутикулы имаго паразитоидов

Для оценки интенсивности окрашивания (меланизации) кутикулы линий w^+ и w^- *H. hebetor* имаго самцов и самок прижизненно замораживали при -20°C на 24 часа. Затем их фотографировали с дорсальной и вентральной стороны тела с помощью цифрового фотоаппарата (Power Shot G9, Canon, Япония) под световым микроскопом (Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen, Германия). Наличие светлого пигмента в кутикуле имаго анализировали с помощью программы Image J (Abramoff *et al.*, 2004; Tomilova *et al.*, 2019). Программа Image J при оценке максимального темного объекта представляет его в виде наименьшего числового значения, соответственно чем светлее анализируемое изображение, тем большее число выдает программа при анализе. Оценивали интенсивность светлой окраски, которую выражали в условных единицах, представляющих собой значения серого, отражающего свет от анализируемого объекта. Из каждой популяции (w^+ и w^-) были взяты 50 самцов и самок. Анализ каждой особи производили индивидуально, выделяя для оценки контур тела от верхней части головной капсулы (не захватывая антенн) до конца брюшка (не затрагивая яйцеклад в случае анализа самок).

Оценка размеров тела имаго паразитоидов

Для оценки длины тела паразитоидов линий w^+ и w^- *H. hebetor* имаго самцов и самок прижизненно замораживали при -20°C на 24 часа. Затем их фотографировали с использованием светового микроскопа (Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen, Германия). Фото были

проанализированы с использованием программного обеспечения AxioVision (v4.6.3.0). У каждой оси измеряли длину тела с вентральной стороны с точностью до 0.01 мм. Измерения включали длину тела от верхней части головной капсулы (не захватывая антенн) до конца брюшка (не затрагивая яйцеклад в случае анализа самок). Из каждой популяции (w^+ и w^-) были взяты 50 самцов и самок.

Приготовление образцов для измерения ФО, дофамина и тирозина

При подготовке образцов для измерения активности фермента объединяли по 5 особей (5 личинок 5 возраста; 5 фарматных имаго; 5 имаго) *H. hebetor* из обеих линий (w^+ и w^-). Поскольку яд, содержащийся в ядовитых железах самок, содержит серпины, ингибирующие профенолоксидазный каскад (Becchimanzì *et al.*, 2020), активность ФО и количество дофамина, тирозина оценивали только в самцах (имаго, фарматные имаго). Пять особей *H. hebetor* помещали в 100 мкл охлажденного ($+4^{\circ}\text{C}$) 0.1 М фосфатного буфера (ФБ, рН 6.4), гомогенизировали в ультразвуковом гомогенизаторе (Bandelin Sonopuls HD 2070 ultrasonic homogenizer, Bandelin Electronic, Germany), дважды центрифугировали (5500г, 10 мин, 4°C). Супернатант использовали для определения активности фенолоксидаз.

Для измерения дофамина и тирозина 5 особей (5 личинок 5 возраста; 5 фарматных имаго; 5 имаго) *H. hebetor* взвешивали, гомогенизировали в 200 мкл 0.2 N хлорной кислоты, содержащей в качестве внутреннего стандарта 2 мкг/мл 3,4-дигидроксибензиламина гидробромида, перемешивали 30 сек на мешалке Vortex для осаждения белка, затем центрифугировали 10 минут (20000г, 4°C) и 50 мкл супернатанта переносили в виалы для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для измерения дофамина и тирозина использовали 10 образцов (1 образец = 5 особей) каждого варианта.

Измерение фенолоксидазной активности

Активность фенолоксидаз (ФО) измеряли по методу (Hall *et al.*, 1995) с модификациями. Аликовту супернатанта гомогената личинок/имаго (10 мкл) добавляли к субстрату (200 мкл) – 2 мМ Допамин гидрохлорид (Sigma-Aldrich) в 0.1 М ФБ рН 6.4 и инкубировали 2 часа при 28°C . Оптическую плотность образующегося дофахрома определяли на планшетном спектрофотометре (Multiskan Ascept, Thermo) при длине волны 475 нм. Активность фермента выражали в изменении оптической плотности инкубационной смеси в ходе реакции за 1 мин и на 1 мг белка. Для измерения ФО использовали 25 образцов (1 образец = 5 особей) каждого варианта.

Анализ содержания дофамина и тирозина

Содержание дофамина и тирозина определяли методом ВЭЖХ, используя методику, описанную в работе Лакшмана и Раджу (Lakshmana, Raju, 1997), с модификациями. Анализ проводили с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Сингапур) с диодно-матричным и флуоресцентным детекторами. Для обработки хроматограмм использовали программное обеспечение Agilent Chem Station B04.03. Выбор оптимальных длин волн возбуждения и эмиссии осуществляли путем сбора спектральных данных в диапазонах 220–380 нм (возбуждение) и 300–500 нм (эмиссия), используя стандарты (1 мкг/мл в 0.2 N хлорной кислоте) L-ДОФА, дофамина, 3,4-дигидроксибензиламина гидробромида (внутренний стандарт), L-триптофана и L-тирофина. Пики идентифицировали по временам удерживания, УФ-спектрам и спектрам флуоресценции. Изократическое разделение проводили на обращенно-фазовой колонке C18 (Zorbax-SB, внутренний диаметр 250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, Agilent, Калифорния, США) с предколонкой (Zorbax-SB, 12,5 × 4,6 мм). Температура термостата колонки составляла 35°C. Подвижная фаза состояла из 13% смеси ацетонитрил/метанол (1:1 по объему) и 87% буфера (25 мМ дигидрофосфат калия, 1.85 мМ натриевой соли октан-1-сульфоновой кислоты в качестве ион-парного реагента, pH 3.0). Скорость потока составляла 1 мл/мин, объем вводимой пробы – 5 мкл. Детекцию проводили с помощью диодно-матричного детектора (сбор спектров UV-Vis от 190 до 500 нм), а также детектора флуоресценции, по двум каналам, настроенным следующим образом: канал 1 – возбуждение при 279 нм и эмиссия при 315 нм для обнаружения L-ДОФА, L-тирофина, 3,4-дигидроксибензиламина гидробромида и дофамина; канал 2 – возбуждение при 279 нм и эмиссия при 340 нм для обнаружения L-триптофана. Количественное определение тирозина и дофамина в образцах проводили методом внутреннего стандарта по калибровочным кривым для каждого из веществ.

Измерение содержания пролина

Концентрацию пролина определяли методом Бейтса с соавт. (Bates *et al.*, 1973) с использованием нингидринового реактива. Пять личинок гомогенизировали в 100 мкл 3%-ной сульфосалициловой кислоты с помощью ультразвукового гомогенизатора, гомогенат центрифугировали (20000 g, 5 мин) при комнатной температуре. Супернатант смешивали с ледяной уксусной кислотой и нингидриновым реагентом в объемном соотношении 1:2:2 и нагревали до 96°C в течение часа. Реакцию останавливали, помещая образец в лед. Оптическую плотность

раствора нингидрин-пролина в толуоле измеряли при 520 нм на планшетном спектрофотометре (Multiskan Ascent, Thermo). Содержание пролина определяли по калибровочной кривой, используя раствор пролина в 3%-ной сульфосалициловой кислоте. Для измерения пролина использовали 30 образцов (1 образец = 5 особей) каждого варианта.

Количество белка

Содержание белка в образцах оценивали с помощью метода Брэдфорда, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта (Bradford, 1976).

Статистический анализ данных

Данные представлены как медиана, квартильные отклонения 25–75%, а также минимальные и максимальные значения. Анализ данных был выполнен при помощи программ STATISTICA 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) и PAST 4.03. Данные были проверены на наличие распределения Гаусса с помощью теста на нормальность Шапиро–Уилка. Данные были нормально распределены, поэтому мы использовали однофакторный параметрический дисперсионный анализ с попарным сравнением – критерий Стьюдента (Т-тест). Равенство дисперсий проверено с помощью теста Левене, в случае неравных дисперсий применен Т-критерий Уэлча. Различия между линиями эктопаразитоида считали значимыми, если $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка интенсивности меланизации кутикулы и размеров тела имаго паразитоида

Фенолоксидазы непосредственно участвуют в склеротизации и меланизации покровов насекомых. Анализ степени меланизации показал достоверные отличия: имаго *H. hebetor* линии *w⁻* имели более темную кутикулу, чем имаго *w⁺*, в кутикуле которых преобладал светлый пигмент (рис. 1а). Измерение размеров тела показало, что имаго линии *w⁺* достоверно крупнее имаго линии *w⁻* ($p \leq 0.05$) (рис. 1б).

Активность фенолоксидаз

Для определения влияния *Wolbachia* на активность фенолоксидаз использовали гомогенат целиго тела разных стадий развития *H. hebetor*. Было отмечено достоверное увеличение (0.043 ± 0.004) фенолоксидазной активности у личинок 5 возраста линии, зараженной *Wolbachia*, по сравнению с линией, свободной от эндосимбионта ($p \leq 0.005$). У фаральных имаго и имаго линии *w⁺* активность

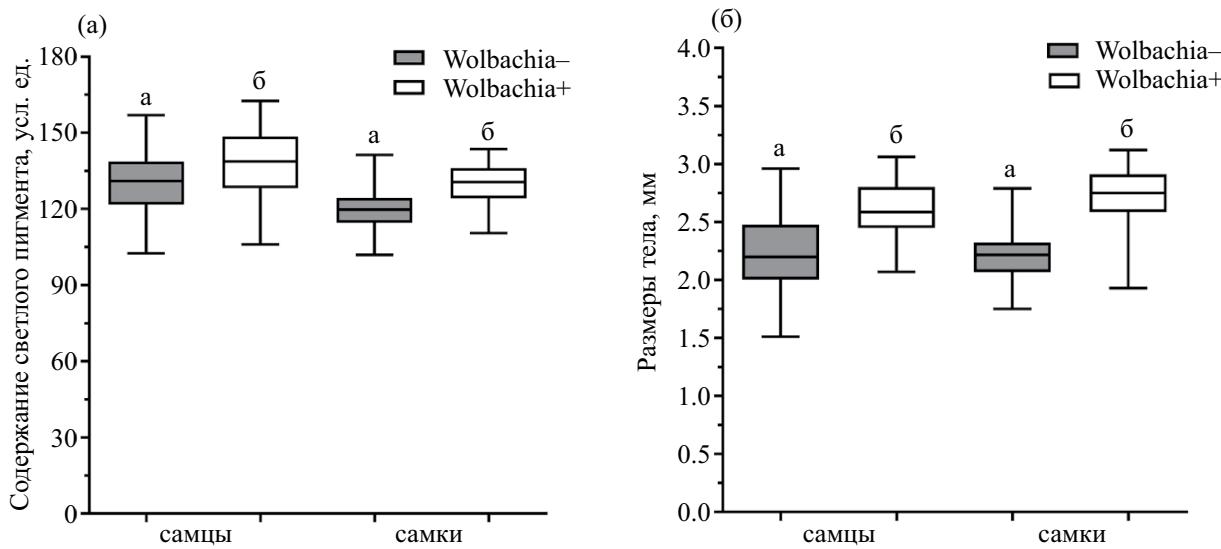


Рис. 1. Морфологические признаки имаго *Habrobracon hebetor*: содержание светлого пигмента в кутикуле имаго *Habrobracon hebetor* двух линий, *Wolbachia*⁻ и *Wolbachia*⁺ (а), размеры имаго самцов и самок линий *Wolbachia*⁻ и *Wolbachia*⁺ (б). Результаты представлены как медиана, квартильные отклонения 25–75%, а также минимальные и максимальные значения. Статистический анализ проводился между самцами и самками линий *Wolbachia*⁻ и *Wolbachia*⁺ (Т-тест, $N = 50$, $p \leq 0.05$); размеры тела имаго паразитоида (Т-тест, $N = 50$, $p \leq 0.05$). Разные буквы показывают существенные различия между однополыми имаго разных линий.

фермента была в 1.5 раза выше, чем у насекомых линии w^- ($p \leq 0.005$; рис. 2).

Количество дофамина и тирозина

Для определения времени удерживания и концентрации биогенных аминов – дофамина и тирозина нами была использована смесь стандартов биогенных аминов: L-3,4-дигидроксифенилаланин (DOPA), L-тироzin(TYR), р-октопамин (OA), внутренний стандарт 3,4-дигидроксибензиламин (IS), дофамин (DA), р-тирамин(TA), серотонин (5-HT), L-триптофан(TRP) в концентрации 1 мкг/мл каждого биогенного амина (рис. 3а). Содержание дофамина и тирозина в образцах имаго линий w^- и w^+ представлены в виде хроматограмм на рис. 3б, 3в соответственно.

Уровень дофамина был достоверно выше в 1.6 раз у личинок w^+ по сравнению с линией w^- ($p \leq 0.005$). У фарматных имаго обеих линий не было достоверных отличий в содержании дофамина. У имаго линии w^- содержание дофамина было достоверно выше в 4.8 раз в сравнении с w^+ ($p \leq 0.005$; рис. 4а). Содержание тирозина также было достоверно выше в 2.6 раза у личинок линии w^- ($p \leq 0.005$; рис. 4б). У фарматных имаго анализ содержания тирозина не выявил достоверных различий (рис. 4б). У имаго линии w^- уровень тирозина был достоверно выше в 2.5 раза по сравнению с имаго линии w^+ ($p \leq 0.005$; рис. 4б).

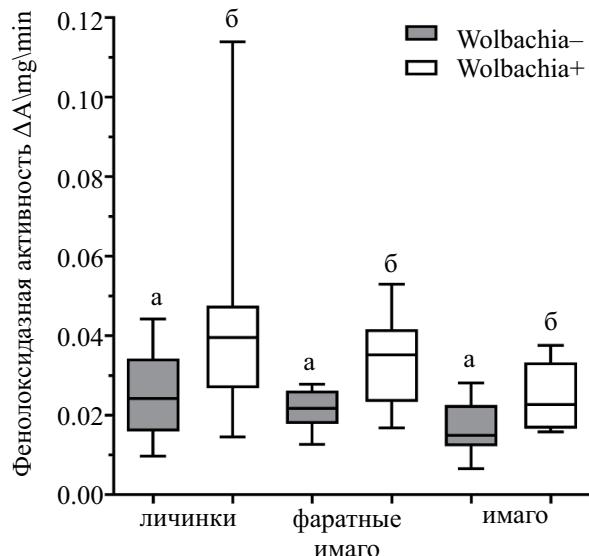


Рис. 2. Изменение фенолоксидазной активности в гомогенатах целого тела разных стадий развития *Habrobracon hebetor* линий *Wolbachia*⁻ и *Wolbachia*⁺. Результаты представлены как медиана, квартильные отклонения 25–75%, а также минимальные и максимальные значения. Статистический анализ проводился между особями одной стадии разных линий: *Wolbachia*⁻ и *Wolbachia*⁺ (Т-критерий Уэлча, $N = 25$, $p \leq 0.005$). Разные буквы показывают существенные различия между особями одной стадии развития разных линий.

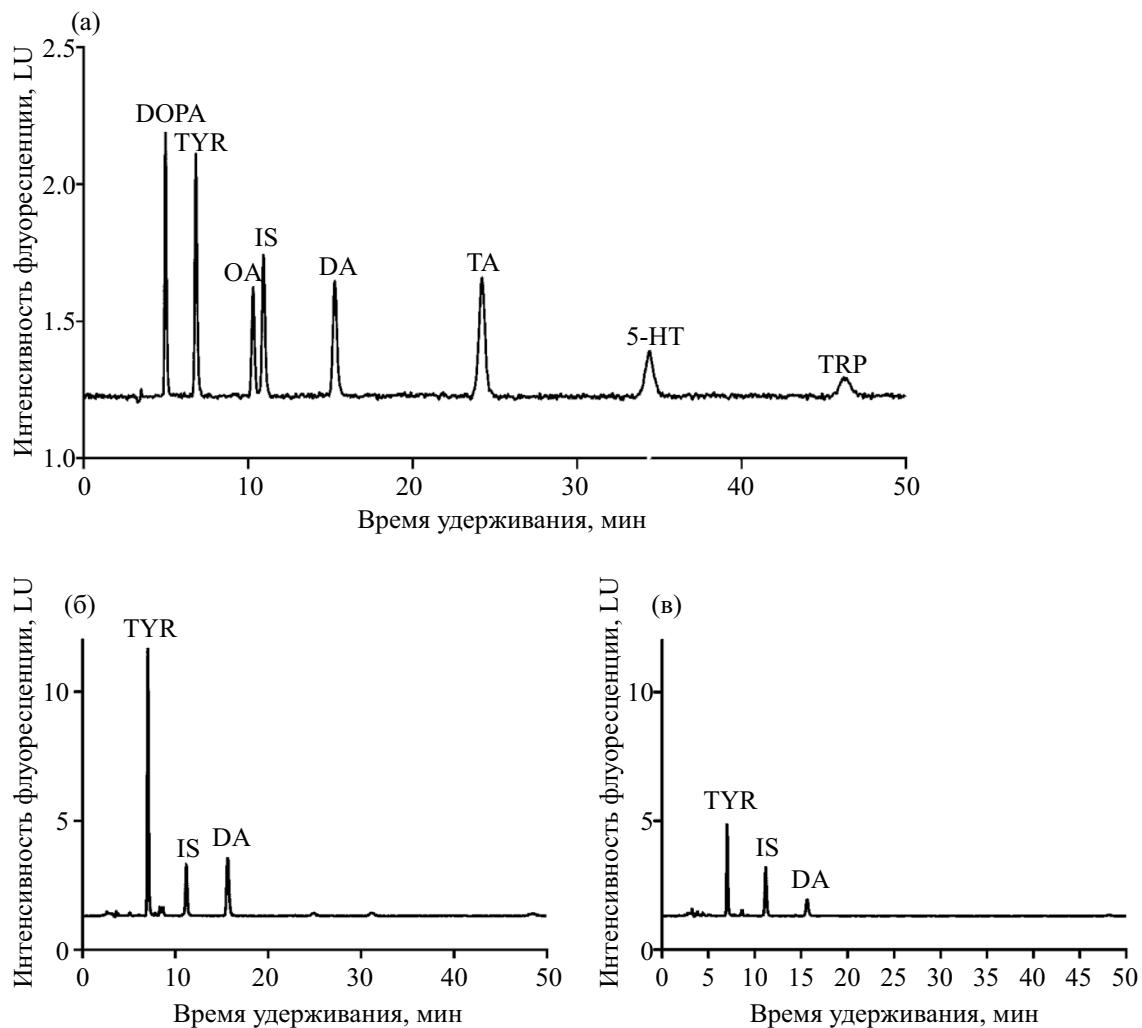


Рис. 3. ВЭЖХ-ФД хроматограммы: а— смесь стандартов биогенных аминов (1 мкг/мл каждого); б — образец имаго *Habrobracon hebetor* (самцы, линия w^-); в — образец имаго *Habrobracon hebetor* (самцы, линия w^+). Обозначения: DOPA — L-3,4-дигидроксифенилаланин, TYR — L-тироzin, OA — р-октопамин, IS — внутренний стандарт 3,4-дигидроксибензиламин, DA-дофамин, TA — р-тирамин, 5-HT — серотонин, TRP — L-триптофан. Длина волны возбуждения — 279 нм, эмиссии — 315 нм.

Содержание белка в гомогенатах целого тела

Анализ гомогенатов целого тела разных стадий развития *H. hebetor* показал достоверное увеличение количества белка у линии w^+ у личинок в 1.3 раза, у фаренгальных имаго — в 1.4 раза, у имаго — в 1.2 раза (рис. 5).

Содержание пролина в гомогенатах целого тела

Количество пролина в личинках линии w^+ было достоверно выше в 1.5 раза, однако у фаренгальных имаго и имаго достоверно больше пролина в 1.4 и 1.7 раза соответственно было у линии w^- (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На двух линиях паразитоида *H. hebetor*, зараженной эндосимбиотической бактерией *Wolbachia* и свободной от нее, были получены данные, свидетельствующие об активном влиянии *Wolbachia* на уровень дофамина и активность фенолоксидаз на всех стадиях развития хозяина. Активность фенолоксидаз была достоверно выше у всех стадий *H. hebetor*, зараженных *Wolbachia*, по сравнению со свободными от эндосимбионта. Уровень дофамина был достоверно выше только у личинок, зараженных *Wolbachia*, по сравнению со свободными от нее. Однако у имаго, свободных от *Wolbachia*, уровень дофамина был достоверно выше по сравнению с зараженными особями.

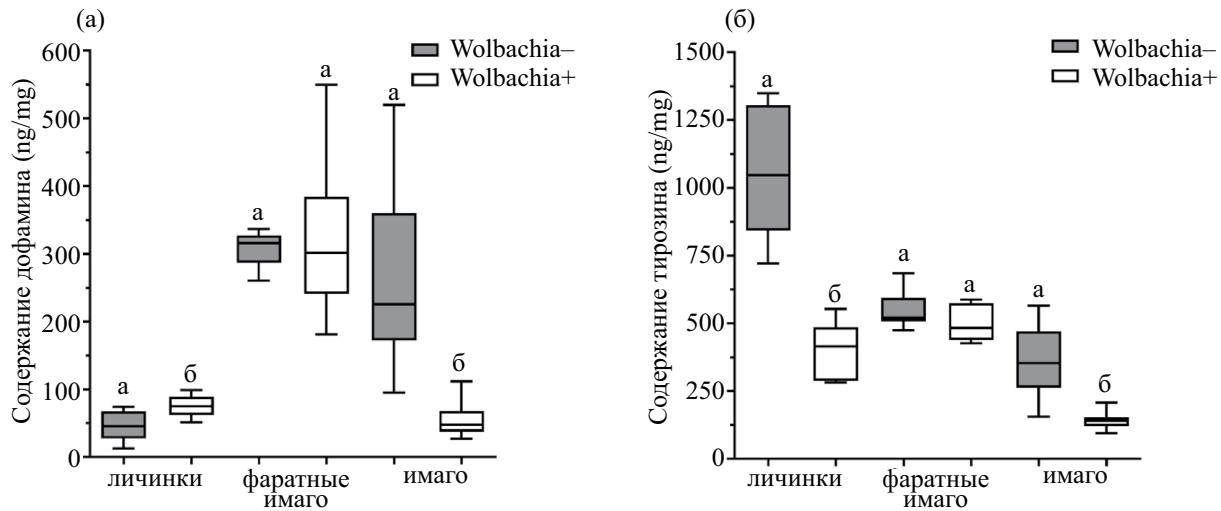


Рис. 4. Содержание дофамина (а) и тирозина (б) в гомогенатах целого тела разных стадий развития *Habrobracon hebetor* двух линий: зараженных *Wolbachia* (*Wolbachia*⁺) и не зараженных (*Wolbachia*⁻). Результаты представлены как медиана, квартильные отклонения 25–75%, а также минимальные и максимальные значения. Статистический анализ проводился между особями одной стадии разных линий: *Wolbachia*⁻ и *Wolbachia*⁺ (Т-тест, N = 10, p < 0.05). Разные буквы показывают существенные различия между особями одной стадии развития разных линий.

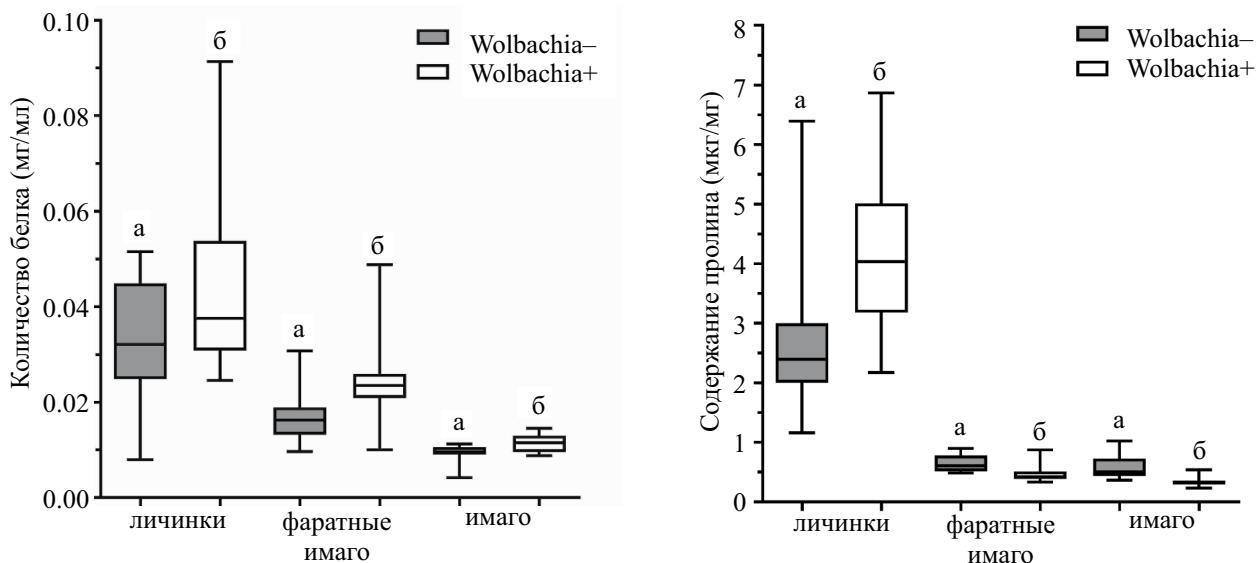


Рис. 5. Общее количество белка в гомогенате целого тела *Habrobracon hebetor* разных стадий развития двух линий *Wolbachia*⁻ и *Wolbachia*⁺. Результаты представлены как медиана, квартильные отклонения 25–75%, а также минимальные и максимальные значения. Статистический анализ проводился между особями одной стадии разных линий: *Wolbachia*⁻ и *Wolbachia*⁺ (Т-тест, N = 25, p < 0.05). Разные буквы показывают существенные различия между особями одной стадии развития разных линий.

При этом количество тирозина у личинок и имаго *W*-линий было достоверно больше. В то же время содержание пролина было выше в личинках *W*⁺

Рис. 6. Содержание пролина в гомогенате целого тела *Habrobracon hebetor* двух линий. Результаты представлены как медиана, квартильные отклонения 25–75%, а также минимальные и максимальные значения. Статистический анализ проводился между особями одной стадии разных линий: *Wolbachia*⁻ и *Wolbachia*⁺ (Т-тест, N = 30, p < 0.05). Разные буквы показывают существенные различия между особями одной стадии развития разных линий.

линий. Одними из основных морфологических отличий данных линий паразитоида являются окраска и размеры тела. Так, насекомые, зараженные

Wolbachia, светлее окрашены. Размер тела как самцов, так и самок был достоверно больше у линии w^+ по сравнению с w^- линией.

Эндосимбионтная бактерия *Wolbachia* обладает широким спектром воздействий на своих хозяев, управляя репродуктивным поведением, продолжительностью жизни и устойчивостью к инфекциям (Werren *et al.*, 2008). Известно, что фенолоксидазный каскад является ключевым механизмом иммунной системы насекомых, участвующим в заживлении ран, клеточной и гуморальной инкапсуляции и противовирусных реакциях (Theopold *et al.*, 2004; Marieshwari *et al.*, 2023). В организме насекомого фенолоксидазы (ФО) находятся в виде неактивных проферментов, профенолоксидаз (проФО) и в основном локализуются в кутикуле, лимфе и гемоцитах, и только при нарушении целостности покровов и/или проникновении иностранных тел происходит их активация (Ashida, Brey, 1995; Koracek *et al.*, 1995; Sugumaran, 2002). ФО катализирует многие ступени каскада, включая превращение тирозина в 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), который затем может быть использован либо для меланизации, либо для склеротизации (Huang *et al.*, 2005). Фенолоксидазы участвуют в нескольких этапах образования меланина (Ashida, Brey, 1997), что основано на широкой субстратной специфичности (Aso *et al.*, 1985; Hall *et al.*, 1995), и подразделяются на 3 группы: (1) тирозиназоподобные фенолоксидазы, (2) фенолоксидаза типа катехолазы и (3) лакказоподобная фенолоксидаза (Marieshwari *et al.*, 2023). У насекомых процесс склеротизации проходит с участием фенолоксидазы лакказного типа (лакказы). Окисление дофамина лакказой (лакказой 2) приводит к образованию дофаминхиона (Yang *et al.*, 2022). На уровне дофаминхиона меланиновый путь раздваивается. В одном случае предпочтение отдается феомеланиновому пути и приводит к образованию феомеланина от желтого до коричневого цвета, в другом – эумеланиновому пути, который приводит к формированию темно-коричнево-черного полимера эумеланина (Barek *et al.*, 2018). Имаго исследуемых нами линий значительно отличались по окраске, и линия w^+ была светлее, чем w^- . Вероятно, активно влияя на ФО-каскад, вольбахия может частично «перепрограммировать» его, способствуя образованию феомеланина в кутикуле имаго. Имаго линии, свободной от эндосимбионта, преимущественно обладали темноокрашенной кутикулой. Сопоставимые результаты были получены на комарах *Ae. aegypti*, зараженных *Wolbachia*. Яйца, полученные от контрольной линии комаров (свободные от *Wolbachia*), были темнее, чем у инфицированных *Wolbachia* особей (Thomas *et al.*, 2011).

Нами получены данные, свидетельствующие об активном влиянии *Wolbachia* на активность

фенолоксидаз на трех стадиях развития хозяина (личинка, фарматные имаго, имаго). Активность фенолоксидаз была достоверно выше у всех стадий *H. hebetor*, зараженных *Wolbachia*, по сравнению со свободными от эндосимбионта. Следует отметить, что тренд, при котором наивысшая активность фермента характерна для личинок, сохранился независимо от наличия или отсутствия бактерии. Полученные нами данные частично согласуются с работой Томаса с соавт., проведенной на *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* и *Ae. aegypti*, где было показано влияние *Wolbachia* на активность фенолоксидаз в гемолимфе хозяина. У инфицированных *D. melanogaster*, *D. simulans* и *Ae. aegypti* активность ФО была значительно выше (Thomas *et al.*, 2011). Повышение уровня фенолоксидазной активности у инфицированных *Wolbachia* эктопаразитоидов может прямо или косвенно защищать их от гибели, вызванной другими инфекциями. Тем самым эндосимбионт заботится об укрывавшем его хозяине для сохранения собственного благополучия путем повышения его иммунного статуса.

Помимо влияния на окраску имаго, *Wolbachia* оказывает влияние и на размер *H. hebetor*. Имаго, зараженные эндосимбионтной бактерией, были достоверно больше особей, свободных от нее. Полученные данные согласуются с ранее полученными Росса с соавт. результатами, где при сравнении длины крыльев комаров *Aedes aegypti*, зараженных *Wolbachia*, с незараженными особями было выявлено достоверное увеличение размеров крыльев зараженных особей комаров (Ross *et al.*, 2014). Размер тела бобовых долгоносиков *Callosobruchus chinensis*, зараженных тремя штаммами *Wolbachia*, был больше, чем у свободных от эндосимбионта особей (Okayama *et al.*, 2016). Было показано, что *Wolbachia* изменяет обмен липидов и сахаров, накапливая энергетический резерв, необходимый во время метаморфоза хозяина (Kryukova *et al.*, 2023; Kargova *et al.*, 2023).

Одним из основных соединений, используемых насекомыми при склеротизации и окраске кутикулы, является дофамин. Помимо этого, он задействован во многих метаболических путях: действует как сигнальная молекула во многих физиологических процессах, в нейротрансмиссии, фагоцитозе, заживлении ран, иммунных реакциях насекомых (Fearon, 1997; Aderem, Underhill, 1999; Neckameyer, Leal, 2002; Ling, Yu, 2005; Marmaras, Lampropoulou, 2009; Tsakas, Marmaras 2010). Нами было обнаружено, что уровень дофамина у *H. hebetor* был достоверно выше у личинок линии w^+ по сравнению с w^- . Личинки линии w^+ активнее питаются и растут. У фарматных имаго достоверной разницы по содержанию дофамина между особями линий w^+ и w^- не было, в то же время у имаго w^- уровень дофамина был достоверно выше, чем

у имаго w^+ . Исходя из полученных данных, можно предположить, что дофамин, являясь не только субстратом для фенолоксидаз, но и нейромедиатором и нейрогормоном, активно участвующим в управлении поведением хозяина, его двигательной активностью, снижается под действием *Wolbachia*. Снижение подвижности и активности имаго линии w^+ выгодно для сохранения ресурсов для *Wolbachia* и ее дальнейшей передачи. По-видимому, *Wolbachia* регулирует содержание ДА у хозяина, встраиваясь в пути его синтеза и деградации. Показано, что *Wolbachia* вызывает повышение уровня дофамина у хозяина (Moreira *et al.*, 2011). В частности, у комаров *A. aegypti*, инфицированных *Wolbachia* wMelPop, уровень дофамина был достоверно выше, чем у свободных от эндосимбионта особей (Moreira *et al.*, 2011). Активация генов, ответственных за синтез дофамина под влиянием *Wolbachia*, была показана в работах, выполненных на *Drosophila* (Gruntenko *et al.*, 2017; Bi *et al.*, 2018). Снижение уровня дофамина было показано у *Drosophila* только для патогенного штамма wMelPop, (Voronin *et al.*, 2009; Gruntenko *et al.*, 2017).

При оценке содержания тирозина – предшественника дофамина и молекулы, стоящей во главе ФО-каскада, было отмечено необычно низкое его количество у личинок и имаго, инфицированных *Wolbachia*, по сравнению с неинфицированной линией (рис. 4). Следует отметить, что тирозин также участвует в биосинтезе белков и меланинов; как предшественник вовлечен в синтез дофамина, октопамина и тирамина или может через путь деградации тирозина расщепляться пятью ферментативными реакциями с образованием ацетоацетата и фумарата, которые могут подвергаться дальнейшему катаболизму по циклу Кребса (Sterkel, Oliveira, 2017; Parkhitko *et al.*, 2020). Известно, что *Wolbachia* может влиять на метаболические пути хозяина, чтобы получить питательные вещества и энергию для собственного выживания и размножения (Yuan *et al.*, 2015; Saucereau *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018). В частности, при исследовании протеома двух линий (с *Wolbachia* и без) *Nasonia vitripennis* были получены достоверные отличия в их белковом составе. Различия касались белков, участвующих в росте и развитии хозяина, катализитической активности, метаболических процессах (Li *et al.*, 2018). В связи с тем, что особи линии w^+ *H. hebetor* крупнее, можно предположить, что значительная часть тирозина используется на построение белка и энергообмен хозяина, в отличие от линии w^- , особи которой меньшего размера. Данные по содержанию белка в гомогенатах имаго паразитоида косвенно подтверждают наши предположения. У имаго линии w^+ содержание белка в гомогенатах было достоверно выше на всех стадиях развития паразитоида.

Кроме того, следует учитывать, что у *Wolbachia* синтез эндогенных аминокислот, в том числе пролина, чрезвычайно ограничен и для синтеза белка и производства энергии она импортирует аминокислоты хозяина (Wu *et al.*, 2004; Fenn, Blaxter, 2006). Пролин участвует во множестве биологических процессов, включая передачу сигналов клетками, защиту от стресса и производство энергии. Свойства пролина как органического осмолита обеспечивают клеточную защиту от абиотического стресса (Klowden, 2013). Нами были получены данные по содержанию пролина в гомогенатах разных стадий развития двух линий *H. hebetor*. Личинки *H. hebetor* линии w^+ содержали достоверно большее количество пролина в сравнении с линией w^- . Однако достоверно большее содержание пролина в фарматных имаго и в имаго мы регистрировали только для линии w^- . Показано, что плотность вольбахии в тканях хозяина варьирует в зависимости от стадии развития (Ge *et al.*, 2020; Ming *et al.*, 2015). Мы предполагаем, что наибольшее количество пролина в зараженных личинках линии w^+ связано с усиленным накоплением энергетических запасов на наиболее интенсивно питающейся стадии развития паразитоида – личинке – для дальнейшего благополучного расходования источника энергии – пролина – на жизнедеятельность как паразитоида, так и эндосимбионта. Затем, по мере прохождения паразитоидом линии w^+ следующих стадий развития, регистрируемое снижение количества пролина и у фарматных имаго и у имаго в сравнении с теми же стадиями линии w^- , возможно, связано с активным расходованием энергии на нужды *Wolbachia*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как любой эволюционно связанный с хозяином эндосимбионт, *Wolbachia* настолько тесно встроилась в жизненный цикл последнего, что часто выступает в двойной роли: помощника и патогена одновременно. Контролируя процесс размножения хозяина, часто перекраивая структуру популяции выгодным для себя образом, бактерия может способствовать и выживанию хозяина, в частности, регулируя его метаболизм и поведение. Несмотря на широкий охват по диагностике вольбахии в различных беспозвоночных, и насекомых в том числе, тонкие механизмы взаимодействия между эндосимбионтом и хозяином изучены на ограниченном числе видов. Важность этих работ неоспорима, однако малоизученным остается влияние *Wolbachia* на иммунные реакции хозяина. Дальнейшее изучение влияния *Wolbachia* на ключевые механизмы иммунитета насекомых, в частности на проФО каскад, поможет внести ясность в особенности тонких механизмов взаимодействия данной бактерии со своим хозяином.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-24-00259.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Исмаилов В.Я., Агасьева И.С., Насмасий А.С. *Habrobracon hebetor* Say — эффективный паразит в борьбе с яблонной плодожоркой // Садоводство и виноградарство. 2020. № 2. С. 52–57.
<https://doi.org/10.31676/0235-2591-2020-2-52-57>
- Abràmoff M.D., Magalhães P.J., Ram S.J. Image processing with ImageJ // Biophotonics Int. 2004. V. 11. P. 36–42.
- Aderem A., Underhill D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages // Annu. Rev. Immunol. 1999. V. 17. P. 593–623.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Ashida M., Brey P.T. Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix // Proc. Nati. Acad. Sci. 1995. V. 92. P. 10698–10702.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10698>
- Ashida M., Brey P.T. Recent advances in research on the insect phenoloxidase cascade. In Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects; Brey, P.T., Hultmark, D.L., Eds.; Chapman and Hall: London. 1997. P. 133–172.
- Aso Y., Kramer K.J., Hopkins T.L., Lookhart G.L. Characterization of haemolymph protyrosinase and a cuticular activator from *Manduca sexta* (L.) // Insect Biochem. 1985. V. 15. P. 9–17.
[https://doi.org/10.1016/0020-1790\(85\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0020-1790(85)90038-1)
- Bagheri Z., Talebi A.A., Asgari S., Mehrabadi M. Wolbachia induce cytoplasmic incompatibility and affect mate preference in *Habrobracon hebetor* to increase the chance of its transmission to the next generation // J. Invertebr. Pathol. 2019. V. 163. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.02.005>
- Barek H., Sugumaran M., Ito S., Wakamatsu K. Insect cuticular melanins are distinctly different from those of mammalian epidermal melanins // Pigment Cell & Melanoma Res. 2018. V. 31. P. 384–392.
<https://doi.org/10.1111/pcmr.12672>
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and soil. 1973. V. 39. P. 205–207.
<https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bi J., Sehgal A., Williams J.A., Wang Y.-F. Wolbachia affects sleep behavior in *Drosophila melanogaster* // J. Insect Physiol. 2018. V. 107. P. 81–88.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.02.011>
- Bi J., Wang Y.-F. The effect of the endosymbiont Wolbachia on the behavior of insect hosts // Insect Sci. 2020. V. 27. P. 846–858.
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12731>
- Bian G., Joshi D., Dong Y., Lu P., Zhou G., Pan X., Xu Y., Dimopoulos G., Xi Z. Wolbachia invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to Plasmodium infection // Science. 2013. V. 340. P. 748–751.
<https://doi.org/10.1126/science.1236192>
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Becchimanzini A., Avolio M., Bostan H., Colantuono C., Cozzolino F., Mancini D., Chiusano M.L., Pucc P., Caccia S., Pennacchio F. Venomics of the ectoparasitoid wasp *Bracoon nigricans* // BMC Genomics. 2020. V. 21. P. 34.
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6396-4>
- Bursell E. The role of proline in energy metabolism. In Energy Metabolism in Insects; Downer R., Eds.; Springer: Boston, MA. 1981. P. 135–154.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9221-1_5
- Carrington L.B., Tran B.C. N., Le N.T. H., Luong T.T.H., Nguyen T.T., Nguyen P.T., Nguyen C.V. V., Nguyen H.T. C., Vu T.T., Vo L.T., Le D.T., Vu N.T., Nguyen G.T., Luu H.Q., Dang A.D., Hurst T.P., O'Neill S. L., Tran V.T., Kien D.T. H., Nguyen N.M., Wolbers M., Wills B., Simmons C.P. Field- and clinically derived estimates of Wolbachia-mediated blocking of dengue virus transmission potential in *Aedes aegypti* mosquitoes // Proc. Natl. Acad. Sci. 2018. V. 115. P. 361–366.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1715788115>
- Cerenius L., Söderhäll K. Immune properties of invertebrate phenoloxidases // Dev. Comp. Immunol. 2021. V. 122. 104098. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104098>
- Evans O., Caragata E.P., McMeniman C. J., Woolfit M., Green D. C., Williams C. R., Franklin C. E., O'Neill S. L., McGraw E.A. Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipiensis* // J. Exp. Biol. 2009. V. 212. V. 1436–1441.
<https://doi.org/10.1242/jeb.028951>
- Fearon D. T. Seeking wisdom in innate immunity // Nature. 1997. V. 388. P. 323–324.
<https://doi.org/10.1038/40967>
- Fenn K., Blaxter M. Wolbachia genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism // Trends Parasitol. 2006. V. 22. P. 60–65.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.12.012>

- Ge C., Hu J., Zhao Z., Hoffmann A.A., Ma S., Shen L., Fang J., Zhu J., Yu W., Jiang W. Phylogeny and density dynamics of Wolbachia infection of the health pest *Paederus fuscipes* Curtis (Coleoptera: Staphylinidae) // Insects. 2020. V. 11. 625. P. 1–11. <https://doi.org/10.3390/insects11090625>
- Gruntenko N.E., Ilinsky Y.Y., Adonyeva N.V., Burdina E.V., Bykov R.A., Menshanov P.N., Rauschenbach I.Y. Various Wolbachia genotypes differently influence host *Drosophila* dopamine metabolism and survival under heat stress conditions // BMC Evol. Biol. 2017. V. 17. P. 15–22. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1104-y>
- Gupta V., Vasanthakrishnan R.B., Siva-Jothy J., Monteith K.M., Brown S.P., Vale P.F. The route of infection determines Wolbachia antibacterial protection in *Drosophila* // Proc. R. Soc. B. 2017. Vol. 284. 20170809. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.0809>
- Hall M., Scott T., Sugumaran M., Söderhäll K., Law J.H. Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning // Proc. Natl Acad. Sci. 1995. V. 92. P. 7764–7768. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7764>
- Hedges L.M., Brownlie J.C., O'Neill S. L., Johnson K.N. Wolbachia and virus protection in insects // Science. 2008. V. 322. P. 702. <https://doi.org/10.1126/science.1162418>
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., Werren J.H. How many species are infected with Wolbachia? A statistical analysis of current data // FEMS microbiology letters. 2008. V. 281. P. 215–220. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x>
- Huang C. Y., Chou S. Y., Bartholomay L. C., Christensen B.M., Chen C.C. The use of gene silencing to study the role of dopa decarboxylase in mosquito melanization reactions // Insect Mol. Biol. 2005. V. 14. P. 237–244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00552.x>
- Ignatova Z., Giersch L.M. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant // Proc. Natl. Acad. Sci. 2006. V. 103. P. 13357–13361. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603772103>
- Jiménez N.E., Gerdzen Z.P., Olivera-Nappa, Á. Salgado J.C., Conca C. A systems biology approach for studying Wolbachia metabolism reveals points of interaction with its host in the context of arboviral infection // PLoSNegl. Trop. Dis. 2019. V. 13. e0007678. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007678>
- Kageyama D., Narita S., Imamura T., Miyashita A. Detection and identification of Wolbachia endosymbionts from laboratory stocks of stored-product insect pests and their parasitoids // J. Stored Prod. Res. 2010. V. 46. P. 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2009.07.003>
- Kanost M.R., Gorman M.J. Phenoloxidases in insect immunity. In the Insect immunology; Beckage N.E., Eds.; Academic Press: San Diego. 2008. P. 69–96. <https://doi.org/10.1016/B978-012373976-6.50006-9>
- Karpova E.K., Bobrovskikh M.A., Deryuzhenko M.A., Shishkina O.D., Gruntenko N.E. Wolbachia Effect on *Drosophila melanogaster* Lipid and Carbohydrate Metabolism // Insects. 2023. V. 14. 357. P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/insects14040357>
- Kempf B., Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high osmolality environments // Arch. Microbiol. 1998. V. 170. P. 319–330. <https://doi.org/10.1007/s002030050649>
- Klowden M.J. Physiological Systems in Insects. Third Edition; Academic Press: Boston, MA, USA. 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-415819-1.00001-5.
- Kopácek P., Weise C., Götz P. The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme // Insect Biochem. Mol. Biol. 1995. V. 25. P. 1081–1091. [http://dx.doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00040-2](http://dx.doi.org/10.1016/0965-1748(95)00040-2)
- Kryukova N.A., Dubovskiy I.M., Chertkova E.A., Vorontsova Y.L., Slepneva I.A., Glupov V.V. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae // J. Insect Physiol. 2011. V. 57. P. 796–800. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.03.008
- Kryukova N.A., Kryukov V.Y., Polenogova O.V., Chertkova E.A., Tyurin M.V., Rotskaya, Alikina T., Kabilov M.R., Glupov V.V. The endosymbiotic bacterium Wolbachia (Rickettsiales) alters larval metabolism of the parasitoid *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) // Arch. Insect Biochem. Physiol. 2023. e22053. <https://doi.org/10.1002/arch.22053>
- Kumar S., Christophide, G. K., Cantera R., Charles B., Han Y.S., Meister S., George Dimopoulos G., Kafatos F.C., Barillas-Mury C. The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. V. 100. P. 14139–14144. <https://doi.org/10.1073/pnas.2036262100>
- Kumar T.K., Samuel D., Jayaraman G., Srimathi T., Yu C. The role of proline in the prevention of aggregation during protein folding in vitro // Biochem. Mol. Biol. Int. 1998. V. 46. P. 509–517. <https://doi.org/10.1080/15216549800204032>
- Lakshmana M.K., Raju T.R. An isocratic assay for norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine using their native fluorescence by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection in discrete brain areas of rat // Anal. Biochem. 1997. V. 246. P. 166–170. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9997>
- Landmann F., Foster J.M., Slatko B., Sullivan W. Asymmetric Wolbachia segregation during early *Brugia malayi* embryogenesis determines its distribution in adult host tissues // PLoSNegl. Trop. Dis. 2010. V. 4. e758. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000758>
- Landmann F., Bain O., Martin C., Uni S., Taylor M.J., Sullivan W. Both asymmetric mitotic segregation and

- cell-to-cell invasion are required for stable germline transmission of Wolbachia in filarial nematodes // *Biol. Open.* 2012. V. 1. P. 536–547.
<https://doi.org/10.1242/bio.2012737>
- Lavine M.D., Strand M.R.* Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple α and β integrin subunits // *Insect Mol. Biol.* 2003. V. 12. P. 441–452.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2003.00428.x>
- Leitner M., Etebari K., Asgari S.* Transcriptional response of Wolbachia-transinfected *Aedes aegypti* mosquito cells to dengue virus at early stages of infection // *J. Gen. Virol.* 2022. V. 103. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001694>
- Li J., Wang N., Liu Y., Qiu S.* Proteomics of *Nasonia vitripennis* and the effects of native Wolbachia infection on *N. vitripennis* // *Peer J.* 2018. V. 6. e4905.
<https://doi.org/10.7717/peerj.4905>
- Ling E., Yu X.-Q.* Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta* // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 35. P. 1356–1366.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.08.007>
- Marieshwari B.N., Bhuvaragavan S., Sruthi K., Mullainadhan P., Janarthanan S.* Insect phenoloxidase and its diverse roles: melanogenesis and beyond // *J. Comp. Physiol. B.* 2023. V. 193. P. 1–23.
<https://doi.org/10.1007/s00360-022-01468-z>
- Marmaras V.J., Lampropoulou M.* Regulators and signalling in insect haemocyte immunity // *Cell. Signal.* 2009. V. 21. P. 186–195.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.014>
- Ming Q.L., Shen J.F., Cheng C., Liu C.M., Feng Z.J.* Wolbachia infection dynamics in *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and their effects on host mating behavior and reproduction // *J. Econ. Entomol.* 2015. V. 108. P. 1408–1415.
<https://doi.org/10.1093/jee/tov053>
- Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A., Lu G., Pyke A.T., Hedges L.M., Rocha B.C., Hall-Mendelin S., Day A., Riegler M., Hugo L.E., Johnson K.N., Kay B.H., McGraw E.A., van den Hurk A.F., Ryan P.A., O'Neill S.L.* A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium // *Cell.* 2009. V. 139. P. 1268–1278.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
- Moreira L.A., Ye Y.H., Turner K., Eyles D.W., McGraw E.A., O'Neill S.L.* The w MelPop strain of Wolbachia interferes with dopamine levels in *Aedes aegypti* // *Parasites & vectors.* 2011. V. 4. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-28>
- Moses S., Sinner T., Zaprasis A., Stoveken N., Hoffmann T., Belitsky B.R., Sonenshein A.L., Bremer E.* Proline utilization by *Bacillus subtilis*: uptake and catabolism // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. P. 745–758.
<https://doi.org/10.1128/jb.06380-11>
- Natarajan S.K., Zhu W., Liang X., Zhang L., Demers A.J., Zimmerman M.C., Simpson M.A., Becker D.F.* Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death // *Free. Radic. Biol. Med.* 2012. V. 53. P. 1181–1191.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.002>
- Neckameyer W.S., Leal S.M.* Biogenic amines as circulating hormones in insects // *Hormones, brain and behavior.* 2002. P. 141–165.
<https://doi.org/10.1016/B978-012532104-4/50040-8>
- Okayama K., Katsuki M., Sumida Y., Okada K.* Costs and benefits of symbiosis between a bean beetle and Wolbachia // *Anim. Behav.* 2016. V. 119. P. 19–26.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.07.004>
- Pan X., Zhou G., Wu J., Bian G., Lu P., Raikhel A.S., Xi Z.* Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. V. 109. E23–E31.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108>
- Parkhitko A.A., Ramesh D., Wang L., Leshchiner D., Filine E., Binari R., Olsen A.L., Asara J.M., Cracan V., Rabnowitz J.D., Brockmann A., Perrimon N.* Downregulation of the tyrosine degradation pathway extends *Drosophila* lifespan // *Elife.* 2020. V. 9. e58053.
<https://doi.org/10.7554/elife.58053>
- Pietri J. E., De Bruhl H., Sullivan W.* The rich somatic life of Wolbachia // *Microbiology open.* 2016. V. 5. P. 923–936.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.390>
- Pimentel A.C., Cesar C.S., Martins M., Cogni R.* The anti-viral effects of the symbiont bacteria Wolbachia in insects // *Front. Immunol.* 2021. V. 11. 626329.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.626329>
- Rafiee-Dastjerdi H., Hejazi M.J., Nouri G.G., Saber M.* Toxicity of some biorational and conventional insecticides to cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and its ectoparasitoid, *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) // *J. Entomol. Soc. Iran.* 2008. V. 28. P. 27–37.
- Rancès E., Ye Y.H., Woolfit M., McGraw E.A., O'Neill S.L.* The relative importance of innate immune priming in Wolbachia-mediated dengue interference // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8. e1002548.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002548>
- Ross P.A., Endersby N.M., Yeap H.L., Hoffmann A.A.* Larval competition extends developmental time and decreases adult size of wMelPop Wolbachia-infected *Aedes aegypti* // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014. V. 91. P. 198–205.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0576>
- Saber M., Abedi Z.* Effects of methoxyfenozide and pyridalyl on the larval ectoparasitoid *Habrobracon hebetor* // *J. Pest Sci.* 2013. V. 86. P. 685–693.
<https://doi.org/10.1007/s10340-013-0528-4>
- Saucereau Y., Valiente Moro C., Dieryckx C., Dupuy J.W., Tran F.H., Girard V., Potier P., Mavingui P.* Comprehensive proteome profiling in *Aedes albopictus* to decipher Wolbachia–arbovirus interference phenomenon // *BMC Genom.* 2017. V. 18. P. 1–14. 10.1186/S12864-017-3985-Y/FIGURES/8

- Scaraffia P.Y., Isoe J., Murillo A., Wells M.A.* Ammonia metabolism in *Aedes aegypti* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2005. V. 35. P. 491–503.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.012>
- Scaraffia P.Y., Wells M.A.* Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females // J. Insect Physiol. 2003. V. 49. P. 591–601.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00031-3)
- Sedarati A., Fathipour Y., Talaei-Hassanlou R.* Destructive effects of *Bacillus thuringiensis* on biological parameters of *Habrobracon hebetor* parasitizing *Helicoverpa armigera* // BioControl. 2014. V. 59. P. 89–98.
<https://doi.org/10.1007/s10526-013-9531-1>
- Sensi P.* History of the development of rifampin // Rev. Infect. Dis. 1983. V. 5. P. 402–406.
- Sterkel M., Oliveira P.L.* Developmental roles of tyrosine metabolism enzymes in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* // Proc. Royal Soc. B: Biological Sciences. 2017. V. 284. 20162607.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2607>
- Sugumaran M.* Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects // Pigment Cell Res. 2002. V. 15. P. 2–9.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.00056.x>
- Teixeira L., Ferreira A., Ashburner M.* The bacterial symbiont Wolbachia induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* // PLoS Biol. 2008. V. 6. e1000002. P. 2753–2763.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002>
- Theopold U., Schmidt O., Soderhall K., Dushay M.S.* Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing // Trends Immunol. 2004. V. 25. P. 289–294.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.004>
- Thomas P., Kenny N., Eyles D., Moreira L.A., O'Neill S. L., Asgari S.* Infection with the wMel and wMelPop strains of Wolbachia leads to higher levels of melanization in the hemolymph of *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans* and *Aedes aegypti* // Dev. Comp. Immunol. 2011. V. 35. P. 360–365.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.11.007>
- Tomilova O.G., Yaroslavtseva O.N., Ganina M.D., Tjurin M.V., Chernyak E.I., Senderskiy I.V., Noskov Y.A., Polenogova O.V., Akhanaev Y.B., Kryukov V.Y., Glupov V.V., Morozov S.V.* Changes in antifungal defence systems during the intermoult period in the Colorado potato beetle // J. Insect Physiol. 2019. V. 116. P. 106–117.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.05.003>
- Tsakas S., Marmaras V.J.* Insect immunity and its signalling: an overview // Invertebr. Surviv. J. 2010. V. 7. P. 228–238.
- Varotto-Boccazz I., Epis S., Arnoldi I., Corbett Y., Gabrieli P., Paroni M., Nodari R., Basilico N., Sacchi L., Gramiccia M., Gradoni L., Tranquillo V., Bandi C.* Boosting immunity to treat parasitic infections: Asaia bacteria expressing a protein from Wolbachia determine M1 macrophage activation and killing of *Leishmania* protozoans // Pharmacol. Res. 2020. V. 161. P. 1–12. 105288.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105288>
- Yorin D.A., Bochernikov A.M., Baricheva E.M., Zakharov I.K., Kiseleva E.V.* Influence of *Drosophila melanogaster* genotype on biological effects of endocymbiont Wolbachia (stamm wMelPop) // Tsitolgiia. 2009. V. 51. P. 335–45.
- Walker T., Moreira L.A.* Can Wolbachia be used to control malaria? // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2011. V. 106. P. 212–217.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900026>
- Wang M.X., Lu Y., Cai Z.Z., Liang S., Niu Y.S., Miao Y.G.* Phenol oxidase is a necessary enzyme for the silkworm molting which is regulated by molting hormone // Mol. Biol. Rep. 2013. V. 40. P. 3549–3555.
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-2428-8>
- Weinert L.A., Araujo-Jnr E. V., Ahmed M.Z., Welch J.J.* The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods // Proc. Royal Soc. B: Biological Sciences. 2015. V. 282. 20150249.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0249>
- Werren J.H., Baldo L., Clark M.E.* Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology // Nat. Rev. Microbiol. 2008. V. 6. P. 741–751. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1969>.
- Wood J.M.* Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis // Annu. Rev. Microbiol. 2011. V. 65. P. 215–238.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102815>
- Wu M., Sun L.V., Vamathevan J., Riegler M., Deboy R., Brownlie J.C., McGraw E. A., Martin W., Esser C., Ahmadinejad N., Wiegand C., Madupu R., Beanan M.J., Brinkac L.M., Daugherty S.C., Durkin A.S., Kolonay J.F., Nelson W.C., Mohamoud Y., Lee P., Berry K., Young M.B., Utterback T., Weidman J., Nierman W.C., Paulsen I.T., Nelson K.E., Tettelin H., O'Neill S. L., Eisen J.A.* Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipiensis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements // PLoS biology. 2004. V. 2. e69.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020069>
- Yang C.-H., Zhang Q., Zhu W.-Q., Shi Y., Cao H.-H., Guo L., Chu D., Lu Z., Liu T.-X.* Involvement of Laccase2 in Cuticle Sclerotization of the Whitefly, *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 // Insects. 2022. V. 13. P. 1–11. 471.
<https://doi.org/10.3390/insects13050471>
- Ye Y.H., Woolfit M., Rance's E., O'Neill S. L., McGraw E.A.* Wolbachia-Associated Bacterial Protection in the Mosquito *Aedes aegypti* // PLoS Negl. Trop. Dis. 2013. V. 7. e2362.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002362>
- Yuan L.-L., Chen X., Zong Q., Zhao T., Wang J.-L., Zheng Y., Zhang M., Wang Z., Brownlie J.C., Yang F., Wang Y.-F.* Quantitative Proteomic Analyses of Molecular Mechanisms Associated with Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila melanogaster* Induced by Wolbachia // J. Proteome Res. 2015. V. 14. P. 3835–3847.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00191>

Zélé F., Santos I., Matos M., Weill M., Vavre F., Magalhaes S. Endosymbiont diversity in natural populations of *Tetranychus* mites is rapidly lost under laboratory conditions // *Heredity*. 2020. V. 124. P. 603–617.
<https://doi.org/10.1038/s41437-020-0297-9>

Zhang Y., Cai T., Ren Z., Liu Y., Yuan M., Cai Y., Yu C., Shu R., He, Shun., Li J., Wong A.C. N., Wan H. Decline in symbiont-dependent host detoxification

metabolism contributes to increased insecticide susceptibility of insects under high temperature // *The ISME Journal*. 2021. V. 15. P. 3693–3703.

<https://doi.org/10.1038/s41396-021-01046-1>

Zug R., Hammerstein P. *Wolbachia* and the insect immune system: what reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of *Wolbachia*-host interactions // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. 1201.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01201>

Effect of *Wolbachia* on morphology and several aspects of host immunity of *Habrobracon hebetor* (SAY)

E. A. Chertkova^{1, #}, A. A. Alekseev^{1, 2}, A. P. Lobanova¹, K. A. Zolotareva¹, N. A. Kryukova¹

¹Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, 11 Frunze St., Novosibirsk, 630091 Russia

²Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, SB RAS, 3 Institutskaya str., Novosibirsk, 630090 Russia

[#]e-mail: chertkaterina@yandex.ru

Two lines of the parasitoid *Habrobracon hebetor* were analysed: one infected with the *Wolbachia* endosymbiotic bacterium and the other free of it. Differences in morphological characters were observed between the lines, specifically in the degree of cuticle melanisation and body size of adult parasitoids. The sizes of both male and female parasitoids were significantly larger in the line infected with the bacterium. The research found that *Wolbachia* affects the levels of dopamine, tyrosine, and phenoloxidase activity, as well as the amount of proline in the whole body homogenate during different stages of parasitoid development.

Keywords: ectoparasitoid, *Wolbachia*, phenoloxidases.