Масштабирование и миниатюризация антеннальных долей и гломерул у насекомых

А. В. Дьякова*, К. Т. Абу Дийак, А. А. Макарова, А. А. Полилов

Биологический факультет Московского государственного университета

имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: anndiakova@yandex.ru

Обонятельная информация играет ключевую роль в процессах, необходимых для выживания и размножения насекомых. Она обрабатывается в антеннальных долях, которые состоят из гломерул – функциональных единиц, уникальная комбинация которых отвечает за определенный запах. Биологические задачи, связанные с запахами, не зависят от размера тела насекомого, который может сильно варьироваться, включая очень маленькие размеры, как у паразитических наездников Megaphragma viggianii (длина тела 200 мкм). Это делает изучение принципов масштабирования и миниатюризации антеннальных долей у насекомых особенно интересным, так как ранее это не исследовалось. Мы изучили данные по 238 видам насекомых из 12-ти отрядов, включая 3D-реконструкцию и детальное исследование антеннальных долей *M. viggianii*. Выяснилось, что увеличение объема антеннальных долей в основном связано с ростом среднего объема гломерулы. Это отличается от ранее изученного масштабирования сенсорных органов насекомых, таких как фасеточные глаза, хордотональные органы и антеннальные сенсиллы, где изменения происходят в первую очередь за счет изменения числа функциональных единиц, а не их размеров. У *M. viggianii* экстремальная миниатюризация антеннальных долей привела к исчезновению ядер в нейронах и слиянию некоторых гломерул, но, похоже, не повлияла на их количество. Эти результаты важны для понимания работы и эволюции сенсорных систем и создают основу для дальнейшего изучения принципов оптимизации обработки сенсорной информации у насекомых.

Введение

Ольфакторная система играет важную роль в жизни насекомых, осуществляя восприятие летучих веществ и обработку связанных с ними стимулов, необходимых для поиска пищи, полового партнёра или места для откладки яиц, ориентации в пространстве, межвидовой и внутривидовой коммуникации и многих других задач (Kamikouchi et al., 2009). Обработка сенсорной информации, воспринимаемой обонятельными сенсиллами, осуществляется в антеннальных долях. Большая часть объёма антеннальных долей приходится на гломерулы – обособленные функциональные единицы, которые формируют связи между собой, образуя сложную сеть (Christensen & Hildebrand, 1987). Число гломерул коррелирует с числом генов ольфакторных рецепторов и примерно отражает число воспринимаемых запахов (Robertson & Wanner, 2006; Vosshall et al., 2000). Количество гломерул у различных насекомых обычно находится в пределах от 10 до 1000, при этом оно достаточно постоянно в пределах вида (Anton & Homberg, 1999; Rospars, 1988). У некоторых насекомых гломерулы в антеннальных долях отсутствуют, например, у некоторых полужёсткокрылых (Kristoffersen et al., 2008) и стрекоз (Rebora et al., 2013).

Среди насекомых есть представители с экстремально маленькими размерами, например, паразитические наездники *Megaphragma viggianii*, длина тела которых составляет около 200 мкм (Polilov, 2017). Несмотря на небольшие размеры *M. viggianii* свойственны сложные формы поведения: самцам необходимо найти самку, а самкам для откладки яиц нужно обнаружить яйца хозяина – *Heliothrips haemorrhoidalis*. Для выполнения этих задач наездникам требуется развитая ольфакторная система, которая сохраняет свои ключевые функции, несмотря на миниатюризацию и значительное упрощение насекомого. Ранее на антеннах *M. viggianii* были обнаружены иннервированные многочисленными ветвящимися отростками чувствительных нейронов мультипоровые плакоидные сенсиллы, по всей видимости, являющиеся ольфакторными (Diakova et al., 2018; Diakova & Polilov, 2021).

Ранее были установлены принципы миниатюризации сенсорных органов у насекомых: уменьшение количества и, зачастую, размеров функциональных элементов органа, при сохранении общего плана и сложности его строения. Например, при миниатюризации сложных глаз уменьшается число фасеток и их диаметр (А. А. Makarova, Diakova, et al., 2022a), но их клеточный состав не меняется (А. Makarova et al., 2015; А. А. Makarova et al., 2019). Для антенн миниатюрных насекомых характерно уменьшение количества сенсилл с уменьшением размера тела (Diakova et al., 2018; Diakova & Polilov, 2020; van der Woude & Smid, 2016), но количество типов сенсилл и их морфология не зависят от размера тела, за исключением редукции вспомогательных клеток в случае экстремальной миниатюризации (А. А. Makarova et al., 2022а). Количество сколопидиев, функциональных единиц джонстонова органа насекомых, уменьшается с уменьшением размера тела, однако общие

принципы строения органа сохраняются даже у мельчайших представителей (Diakova et al., 2022).

Для миниатюрных насекомых также показано уменьшение количества сегментов антенн (Polilov, 2015), вплоть до одного сегмента у самцов паразитического наездника *Dicopomorpha echmepterygis*, считающихся самыми мелкими известными насекомыми (Mockford, 1997). Несмотря на то, что существует достаточное понимание механизмов миниатюризации сенсорных органов, масштабирование нервных центров обработки сенсорной информации пока исследовано очень ограниченно и разрозненно. Для микроскопических наездников *Trichogramma evanescens* и рабочих муравьёв *Atta vollenweideri* установлено, что от внутривидовой вариации длины тела зависит количество гломерул в антеннальных долях (Kelber et al., 2010; van der Woude & Smid, 2016) и, в случае *T. evanescens*, также объем гломерул. Ранее было установлено, что у семейства Vespidae объемы антеннальных долей увеличиваются с ростом размеров тела (O'Donnell & Bulova, 2017). У рабочих шмелей наблюдается увеличение объема антеннальных долей у более крупных особей, тогда как у рабочих медоносных пчел такой корреляции не выявлено (Mares et al., 2005).

Данная работа посвящена исследованию ультраструктуры антеннальных долей миниатюрных *M. viggianii*, а также выявлению закономерностей масштабирования антеннальных долей и гломерул в их составе у насекомых из различных отрядов. Особенности строения ольфакторной системы, связанные с её миниатюризацией, представляют большой интерес для понимания её функционирования и эволюции. Принципы оптимизации сенсорной системы могут также быть использованы в бионике для изготовления эффективных миниатюрных сенсоров.

Материалы и методы

Материал

Имаго *Megaphragma viggianii* Fusu, Polaszek, and Polilov 2022 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) были выведены из яиц *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché, 1833) (Thysanoptera: Thripidae). Были использованы данные (помеченные в Приложении 1 знаком *), полученные в предыдущих исследованиях (Макарова, 2013 (кандидатская диссертация); Makarova, Polilov, 2013, 2013a; 2017, 2017a; Polilov, Makarova, 2017; Polilov et al., 2019; Makarova et al., 2020; Veko, Polilov, 2020, 2022; Makarova, Polilov, 2022; Veko et al., 2024)

FIB-SEM

Детальный протокол можно найти в предыдущей публикации (Polilov et al., 2021). Голову отделяли от тела в холодном фиксаторе и сразу же переносили в свежий фиксатор при температуре 4°С на 1 час. Фиксатор состоял из 1% глутарового альдегида (GA) и 1% оксида осмия (OsO4) в 0.1 М какодилатном буфере (pH = 7.2). После этого материал промывали в том же буфере и фиксировали в течение 2 часов в 2% GA в буфере при температуре 4°С. Затем материал снова промывали в буфере и проводили постфиксацию в 2% OsO4 в буфере в течение 16 часов при 4°С. После фиксации материал промывали бидистиллированной водой (ddH2O), а затем обрабатывали 1% раствором уранилацетата (UA) в ddH2O в течение ночи при 4°C, после чего помещали (в том же растворе) в термостат на 2 часа при 50°С. Затем образцы промывали в ddH2O и контрастировали раствором аспарата свинца по Уолтрону (2 часа, 50°С). После этого материал снова промывали в ddH2O. Далее проводили обезвоживание материала с использованием этанола и ацетона. Материал помещали в смесь заливочной среды (Epon, Sigma) и ацетона (1:2) на 2 часа при комнатной температуре (RT), а затем в смесь 1:1 на ночь при RT, после чего образцы переносили в заливочную среду на 5 часов при RT. В конечном итоге образцы помещали в силиконовые заливочные формы со свежим Ероп и оставляли в термостате на 48 часов при 60°С.

Образцы *M. viggianii* исследовали с использованием FIB-SEM (сканирующий электронный микроскоп Zeiss Merlin, оснащенный фокусированным ионным пучком Zeiss Capella) (Xu et al., 2017). Для визуализации всей головы использовали скорость сканирования 2 МГц с первичным электронным пучком силой 2 нА, при этом конечные воксели имели размеры 8 × 8 нм по осям х и у, а срез выполнялся с шагом 8 нм. Были получены стеки изображений для трех образцов (один самец и две самки).

Гистология

Материал был фиксирован в ФСУ (формальдегид, уксусная кислота, этанол) и залит в Аралдит. Полученные блоки использовались для изготовления полных серий поперечных и продольных срезов толщиной 0,5 или 1 мм с использованием микротома Leica RM2255. Срезы окрашивали толуидиновым синим и пиронином и фотографировали под микроскопом Olympus BX43 с камерой Tucsen TCC-6.1ICE. Затем фотографии были объединены в один стек, выровнены и откалиброваны.

3D реконструкция

3D реконструкция и вычисление объемов клеток и антеннальных долей были выполнены в Bitplane Imaris и VAST Lite (Volume Annotation and Segmentation Tool) (Berger et al., 2018). Рендеринг анимаций был сделан в программе Blender.

Статистический анализ

Тест на нормальность, описательная статистика и SMA были выполнены в программной среде R с использованием пакета *smatr* для SMA (Warton et al., 2012).

Результаты

Трехмерная реконструкция антеннальных долей M. viggianii

Были реконструированы антеннальные доли и гломерулы антеннальных долей самца и двух самок *M. viggianii*. Антеннальные доли *M. viggianii* представляют из себя бобовидные структуры. Было обнаружено, что в каждой антеннальной доле самца *M. viggianii* содержится 31 гломерула, у самки 1 – 57 гломерул, самки 2 – 56 гломерул. Гломерулы *M. viggianii* представляют из себя нейропилярные структуры, отделенные друг от друга отростками крупных, содержащих ядра глиальных клеток, тела которых лежат на периферии антеннальных долей (Рис. 1). Стоит отметить, что это практически единственные ядросодержащие клетки в антеннальных долях, так как лишь единичные нейроны антеннальных долей обладают ядрами, а тела рецепторных нейронов находятся в антеннах. Гломерулы левой и правой антеннальных долей, исходя из их расположения и объемов (Рис. 2, Видео 1, Приложение 2). В нескольких гломерулах были обнаружены остатки стенок глиальных клеток, говорящих о слиянии двух мелких гломерул в одну более крупную (Рис. 1).

Объем антеннальных долей у самца составил 1117,7±53,9 мкм³, у самок в среднем – 2333,1 мкм³. При этом общий объем гломерул самца – 599,3±0,4 мкм³, самок – 1393,25 мкм³. В среднем объем одной гломерулы самца – 19,3±10,7, минимальный объем – 3,6, максимальный – 64,0 мкм³. Средний объем гломерулы самок – 24,65 мкм³ (4,5 мкм³ – 118,3 мкм³). Процентное соотношение объема гломерул к объему антеннальных долей у самца – 54%, у самок – 60%; отношение объема антеннальных долей к объему мозга – 2,7% у самца, 5,4% – у самки (Приложение 1, Приложение 2).



Рисунок 1. Гломерулярная структура антеннальных долей самца *M. viggianii*, FIB-SEM. Отростки обозначенной розовым цветом глиальной клетки разделяют гломерулы, обозначенные разными цветами. Стрелочка указывает на остатки выроста глиальной клетки между слитыми гломерулами. an – антеннальный нерв, gc – глиальная клетка, gcn – ядро глиальной клетки, gl – гломерула.



Рисунок 2. Морфология гломерул левой антеннальной доли самца *M. viggianii*. А: Поперечные срезы антеннальной доли в направлении антериорно – постериорно, с интервалом в 1 мкм, FIB-SEM. В: Сегментации гломерул в (А). Цвета соответствуют цветам, использованным в Видео 1С: Антериорный вид 3D поверхностей сегментаций (В). D – дорсально, М – медиально, V – вентрально, L – латерально, А – антериорно, Р – постериорно.

Обсуждение

Строение и миниатюризация антеннальных долей M. viggianii

Гломерулы *M. viggianii* выделяются отсутствием характерной субструктуры (Рис. 2) – у крупных насекомых, как правило, она наблюдается, например, у медоносных пчел периферию гломерулы образуют отростки рецепторных нейронов, а внутреннюю – проекционные нейроны (Galizia & Rössler, 2010). Другим важным отличием является то, что антеннальные доли *M. viggianii* практически полностью лишены ядросодержащих клеток (за исключением глиальных клеток, а также единичных проекционных нейронов). У крупных насекомых все нейроны антеннальных долей содержат ядро, при этом тела клеток лежат вокруг гломерулярного нейропиля (Schachtner et al., 2005). Ранее было показано, что в головном мозге самки *M. viggianii* ядрами обладают лишь 360 нейронов (Desyatirkina et al., 2023), ядра остальных нейронов лизируются вследствие крайней степени миниатюризации насекомого (A. A. Makarova, Veko, et al., 2022).

Половой диморфизм в количестве гломерул у *M. viggianii* (у самок в 1,8 раз больше) связан, по всей видимости, с наличием на антеннах самок двух ольфакторных сенсилл MPS2, иннервированных дендритами 19–22-х чувствительных нейронов (данные сенсиллы отсутствуют у самцов) (Diakova et al., 2018; Diakova & Polilov, 2021). Так как известно, что число гломерул коррелирует с числом распознаваемых ольфакторных стимулов (Robertson & Wanner, 2006; Vosshall et al., 2000), можно заключить, что самки *M. viggianii* способны распознавать примерно в 2 раза больше запахов по сравнению с самцами. Более широкий репертуар распознаваемых запахов у самки связан, видимо, с тем, что ей необходимо найти под кожицей листа яйцо хозяина-трипса и оценить его пригодность для заражения. Вдвое больший объем антеннальных долей у самки объясняется бо́льшим количеством гломерул. В то же время, средний объем гломерулы у самца и самки примерно одинаков вследствие того, что их ультраструктура одинакова у обоих полов.

Масштабирование антеннальных долей у насекомых

Были проведены регрессионные анализы объемов антеннальных долей, числа гломерул и среднего объема гломерулы у 238 видов насекомых из 12-ти отрядов. Насекомые с агломерулярными антеннальными долями не были включены в анализ. Большая часть данных была получена из литературы, дополнительно с помощью 3D реконструкции были получены данные об объемах антеннальных долей 27-ми видов насекомых из 5-ти отрядов (Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, Psocodea, Thysanoptera), в том числе 14-ти видов миниатюрных насекомых размером менее 1 мм (Приложение 1). Регрессионные анализы были проведены для следующих групп: насекомые в целом, самцы и самки по отдельности, а также для 6-ти отрядов, по которым было собрано наибольшее количество данных (Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera).

Объем антеннальных долей

Самые крупные антеннальные доли обнаружены у самки *Manduca sexta* (Lepidoptera) с длиной тела 45 мм. Их объем составил 71600000 мкм³, что в 64737 раз больше самых маленьких антеннальных долей миниатюрного насекомого *Scydosella musawasensis* (Coleoptera) с длиной тела 0,3 мм (Приложение 1). Для насекомых в целом была обнаружена изометрическая зависимость объема антеннальных долей относительно объема мозга, и аллометрическая относительно длины тела (Рис. 3А, В, Таблица 1). Из этого следует, что объем антеннальных долей у насекомых растет с размером тела, но при этом относительный

объем, который антеннальные доли занимают в мозге, не меняется с изменением размера тела. Среди отрядов корреляция была установлена для отрядов Coleoptera и Hymenoptera (а также корреляция с длиной тела у Lepidoptera), для остальных отрядов не было достаточно данных, либо корреляция не была обнаружена (Таблица 1).

		Зависимая переменная/независимая переменная					
		Объем	Объем АД/	число	средний	средний	число
		АД/	длина тела	гломерул/	объем	объем	гломерул/
		объем		длина тела	гломерулы	гломеру	Объем АД
		мозга			/ длина	лы/	
					тела	Объем	
D		1.00.00	a 0.04	0.00	0.10.1	АД	0.04
Bce	sl	1,09**	2,03*	-0,98	2,13*	0,84**	0,3*
насекомые	el	-2**	4,35*	3,14	1,85*	-1,21**	0,23*
самки	sl	1,05**	2,38**	-1	2,18*	0,83**	0,31*
	el	-	3,77**	3,17	1,88*	-1,15**	0,17*
		2,04**					
самцы	sl	1,05**	2,38**	0,56	2,28*	0,84**	0,22
	el	-	3,77**	1,44	1,75*	-1,1**	0,68
		2,12**					
Blattodea	sl	N/A	-8,05	N/A	N/A	N/A	N/A
	el	N/A	19,13	N/A	N/A	N/A	N/A
Coleoptera	sl	1,01**	1,96*	-1,24	5,56*	N/A	N/A
	el	-	4,2*	3,33	-3,14*	N/A	N/A
		1,44**					
Diptera	sl	0,4	1,09	-0,52	3,06*	-1,74*	0,37*
	el	2,21	4,46	2,1	1,62*	12,09*	-0,08*
Hemiptera	sl	-2,24	-9,4	-2,62	N/A	N/A	1,15*
	el	21,62	11,93	3,76	N/A	N/A	-4,06*
Hymenopte	sl	1,06**	2,08*	0,58**	1,82*	0,74*	0,23*
ra	el	-	4.84*	1.92**	2.3*	-1.15*	0.85*
		1,57**	,	,	,	,	,
Lepidoptera	sl	N/A	2,2*	0,17	3,34	0,93**	0,05
	el	N/A	4*	1,58	0,13	-1,88**	1,47
Orthoptera	sl	N/A	N/A	2,48	-2,6	N/A	N/A
-	el	N/A	N/A	-1,45	8,1	N/A	N/A

Таблица 1. Slope и elevation регрессионных анализов объемов АД (антеннальных долей), числа гломерул и среднего объема гломерулы у насекомых. Аллометрия обозначена знаком *, изометрия – **, отсутствие обозначения обозначает отсутствие корреляции (p>0,05). рзначения параметра slope и корреляции указаны в Приложении 3. sl – slope, el – elevation, N/A – недостаточно данных для анализа.



Рисунок 3. Зависимость основных характеристик антеннальных долей от размера тела, объема мозга и объема антеннальных долей у насекомых. А: объем антеннальных долей зависит от объема мозга. В: объем антеннальных долей коррелирует с длиной тела. С: число гломерул не зависит от с длины тела. D: средний объем гломерулы коррелирует с длиной тела. Е: средний объем гломерулы коррелирует с объемом антеннальных долей. F: число гломерул зависит от объема антеннальных долей.

Число гломерул

Наименьшее число гломерул было обнаружено у *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera) и *Scaphoideus titanus* (Hemiptera) – всего лишь 9 и 13 гломерул, при том, что их длину тела нельзя назвать миниатюрной (2,6 мм и 13,0 мм соответственно). В 111 раз больше гломерул – около 1000 – у *Locusta migratoria* (Orthoptera) с длиной тела 60,0 мм и *Acilius sulcatus* (Coleoptera) размером 16,3 мм (Приложение 1).

Ни у одной из групп, за исключением Hymenoptera, не обнаруживается корреляция числа гломерул с размером тела (Рис. 3С, Таблица 1). Число гломерул коррелирует с числом генов ольфакторных рецепторов и, видимо, примерно отражает число воспринимаемых

запахов (Robertson & Wanner, 2006; Vosshall et al., 2000). Соответственно, число гломерул должно зависеть не от размера тела, а от необходимости в восприятии большего или меньшего числа запахов, которая в свою очередь зависит от биологии вида. Данная закономерность схожа с той, которая была ранее получена при изучении влияния миниатюризации на число типов сенсилл, которое также не зависит от размера тела и отражает необходимость в получении разнородной сенсорной информации (Diakova et al., 2018).

Среди миниатюрных насекомых (меньше 1 см) число гломерул известно только для двух видов: *M. viggianii* и *Trichogramma evanescens* (Hymenoptera) (Таблица 1). У самца и самки *M. viggianii* далеко не наименьшее число гломерул среди насекомых (31 и 56,5 гломерул соответственно), однако, это наименьшее значение для отряда Hymenoptera. У *Trichogramma evanescens*, другой миниатюрной паразитической осы размером тела 0,4 мм, их 100.

Несмотря на отсутствие корреляции числа гломерул с размером тела, число гломерул демонстрирует аллометрическую зависимость с объемом антеннальных долей у насекомых при рассмотрении всех данных вместе (Рис. 3 F), а также у части исследованных групп (самки насекомых, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera). В этих группах число гломерул вносит свой вклад в рост объема антеннальных долей с ростом размера тела.

Средний объем гломерулы

Наиболее крупные гломерулы наблюдаются у *Periplaneta americana* (Blattodea) с длиной тела 40,0 мм – 1771200 мкм³ (Приложение 1). Это в 175366 раз больше, чем объем самых маленьких гломерул у *Aethina tumida* (Coleoptera) (5,7 мкм³), с длиной тела 10,1 мм.

Средний объем гломерулы аллометрически коррелирует с размером тела у всех групп (Рис. 3D), за исключением Lepidoptera и Orthoptera, для Blattodea и Hemiptera недостаточно данных (Таблица 1). При этом для всех групп, по которым достаточно данных, выявлена корреляция объема антеннальных долей и среднего объема гломерулы (Рис. 3E, Таблица 1), что делает объем гломерул основным фактором, объясняющим масштабирование антеннальных долей при изменении размеров тела.

Таким образом, при росте размеров тела насекомых наблюдается увеличение абсолютного объема антеннальных долей, при котором объем долей относительно объема мозга остается неизменным. Увеличение объемов антеннальных долей с увеличением размеров тела было ранее показано для семейства Vespidae. При этом относительный размер оптических долей увеличивался с увеличением мозга быстрее, чем относительный объем антеннальных долей (O'Donnell & Bulova, 2017). Исследования также проводились среди крупных и мелких особей одного вида. Для рабочих шмелей было показано, что у крупных особей мозг крупнее, и большая часть его компонентов увеличиваются в той же степени что и весь мозг, в том числе и антеннальные доли. В то же время для рабочих медоносных пчел не было обнаружено достоверного увеличения как размеров мозга, так и относительного объема антеннальных долей (Mares et al., 2005). Другое исследование было проведено на крупных и мелких особях миниатюрной паразитической осы *T. evanescens*. Было обнаружено, что у мелких ос как абсолютный, так и относительный объемы гломерул меньше, чем у крупных (van der Woude & Smid, 2016).

Рост объема антеннальных долей для всех групп (насекомые в целом, самцы и самки по отдельности, а также для 6-ти отрядов) объясняется ростом среднего объема гломерулы, а также для некоторых – увеличением числа гломерул. Это отличается от исследованного ранее масштабирования фасеточных глаз, антеннальных сенсилл и хордотональных органов насекомых, происходящего в первую очередь за счет увеличения числа функциональных единиц, а не их размеров (Diakova et al., 2022; А. А. Makarova, Diakova, et al., 2022а). Возможно, что увеличение размеров гломерул происходит за счет большего количества ольфакторных рецепторных нейронов и локальных интернейронов, а также их более интенсивного ветвления.

Вариативность числа и объемов гломерул внутри вида

Как правило, размеры и число гломерул у насекомых отличаются постоянством среди особей одного вида: во многих случаях индивидуальные гломерулы возможно определить, исходя из их размера и расположения (Laissue et al., 1999), и даже составить атлас с точностью до единичных гломерул (Grabe et al., 2015; Shankar & McMeniman, 2020). Однако встречаются виды насекомых, у которых объем и число обонятельных гломерул по разным причинам варьируются.

У разных видов эта вариативность ассоциирована с влиянием широкого спектра факторов. Такими факторами, например, являются биологические задачи особи, ее половая и кастовая принадлежности. Половой диморфизм в количестве гломерул у исследованных нами *M. viggianii* (у самок в 1,8 раз больше) связан, по всей видимости, с наличием на антеннах самок двух дополнительных ольфакторных сенсилл – мультипоровых плакоидных сенсилл (PS), отсутствующих у самцов (Diakova et al., 2018; Diakova & Polilov, 2021). Так как известно, что число гломерул коррелирует с числом распознаваемых ольфакторных стимулов (Gao et al., 2000), можно заключить, что у самок *M. viggianii* более широкий репертуар узнаваемых запахов. По всей видимости, это связано с тем, что ей необходимо найти под кожицей листа яйцо хозяина-трипса и оценить его пригодность для заражения. При этом средний объем гломерулы у самца и самки примерно одинаков вследствие того, что их ультраструктура одинакова у обоих полов. Вдвое больший объем антеннальных долей у самки объясняется бо́льшим количеством гломерул. Разница в объемах антеннальных долей обнаруживается и у самок и самцов крупных насекомых, например, *Manduca sexta*, однако антеннальные доли больше у самцов, так как им необходимо искать самку по запаху. Эта разница формируется за счет специфических для самцов гломерул и макрогломерулярного комплекса (El Jundi et al., 2009). Значительные различия в числе гломерул между полами наблюдаются, например, у *A. mellifera* (Arnold et al., 1985; Smid et al., 2003). У пчел *Melipona scutellaris* этот параметр различается между рабочими особями, фертильными самками и трутнями (Roselino et al., 2015).

Биологические задачи также предполагают разное число очень крупных гломерул – макрогломерул, наличие которых связывают с распознаванием феромонов, в частности, с целью поиска партнера у самцов (Arnold et al., 1985; Couto et al., 2021). Макрогломерулы находят и у самок (Roselino et al., 2015), однако их функция не установлена точно. Вариацию числа макрогломерул наблюдают внутри каст у пчел *M. scutellaris* (Roselino et al., 2015) и у рабочих особей муравьев-листорезов *A. vollenweideri* и *A. sexdens*, у которых она связана с участием макрогломерул в отслеживании феромонов пути (trail pheromone). Только крупные рабочие особи этих видов покидают гнездо, что объясняет отсутствие макрогломерул у маленьких рабочих (Kleineidam et al., 2005).

Другим фактором, определяющим вариативность гломерул, является размер тела: так, у трихограммы *Trichogramma evanescens* число гломерул не зависит от размера тела, но их объем у мелких особей меньше, чем у крупных (van der Woude & Smid, 2016), а у рабочих *A. vollenweideri* и *A. sexdens* число и объем гломерул у крупных особей значительно выше, чем у мелких (Kelber et al., 2010; Kleineidam et al., 2005).

Разброс числа гломерул у особей одного вида может объясняться и тем, что у некоторых видов насекомых гломерулы могут сливаться. У ос *Cotesia glomerata* и *C. rubecula* крупные гломерулы могут быть представлены у некоторых особей в виде двух гломерул меньшего размера (Smid et al., 2003). Вариации числа гломерул объясняются слиянием двух гломерул в одну у рабочих особей и трутней медоносной пчелы *Apis mellifera* (Arnold et al., 1985) и у тутового шелкопряда *Bombyx mori*. У последних также наблюдали появление дополнительных гломерул небольшого размера и различия числа гломерул между правой и левой антеннальными долями у одной особи (Kazawa et al., 2009).

Колебание в числе мелких по размеру гломерул было описано для многих видов насекомых (*Drosophila melanogaster* (Laissue et al., 1999); *Helicoverpa assulta* (Berg et al., 2002); *Manduca sexta* (Rospars & Hildebrand, 1992). Нами также были обнаружены слитые гломерулы в антеннальных долях самца *M. viggianii*, что позволяет объяснить слиянием гломерул и вариативность в числе гломерул у двух самок (56 и 57 гломерул).

Есть несколько исследований, предполагающих, что различия в условиях среды и индивидуальном опыте особей у рабочих пчел приводят к различиям в объеме их антеннальных долей и гомологичных гломерул. У *М. scutellaris* недавно вылупившиеся рабочие особи обладают в 2 раза меньшим объемом гломерул, чем обычные рабочие. Вероятно, это является следствием незавершенности процесса формирования мозга у первых и перестроек нервных структур вследствие обучения у вторых (Roselino et al., 2015). У рабочих медоносных пчел наблюдается вариативность объема антеннальных долей и гломерул (Winnington et al., 1996), которая может быть связана с различиями в условиях, в которых выросла особь (разные колонии, сезоны и т.д.) (Arnold et al., 1985).

Некоторые авторы говорят о том, что вариабельность числа, объема и расположения обонятельных гломерул, возможно, связана с активным эволюционным процессом и приспособлением к окружающей среде. В частности, с репертуаром воспринимаемых особью запахов (как у жуков-усачей *A. glabripennis*) (Mitchell et al., 2017). Показательным является сравнительный анализ строения 4х видов шершней (*Vespa crabro, V. mandarinia, V. orientalis, V. velutina*), который обнаружил значительную вариативность между видами в числе гломерул, в особенности, в кластере, который предположительно отвечает за систему распознавания «свой-чужой». Интересно, что азиатские популяции *V. mandarinia* и *V. velutina* обладают большим числом гломерул в этом кластере, чем европейские, – авторы связывают это с большим видовым разнообразием шершней в Азии (Couto et al., 2021).

Также в некоторых случаях причиной ложной вариативности могут быть ограничения метода.

Заключение

Проведенное исследование выявило, что объем антеннальных долей растет вместе с длиной тела насекомого, но их относительный объем в мозге при этом не изменяется. Число гломерул не коррелирует с размером тела, за исключением отряда Hymenoptera, что, видимо, связано с зависимостью числа гломерул от необходимости в восприятии разного репертуара запахов. Данная закономерность схожа с ранее выявленной при изучении влияния миниатюризации на количество типов сенсилл: их число также не зависит от размера тела, но отражает важность получения разнообразной сенсорной информации для вида (Diakova et al., 2018). При этом во всех исследованных группах насекомых была обнаружена корреляция объема антеннальных долей и среднего объема гломерулы. Таким образом, масштабирование антеннальных долей при изменении размеров тела происходит за счет изменения их объема, которое в первую очередь объясняется изменением среднего объема гломерулы. Это разительно отличается от основного принципа масштабирования сенсорных органов насекомых, состоящего, напротив, в изменении числа функциональных единиц (Diakova et al., 2022; A. A. Makarova, Diakova, et al., 2022a). В случае экстремальной степени миниатюризации у *M. viggianii* кроме крайне малых значений объемов антеннальных долей и среднего объема гломерул наблюдались слияние некоторых гломерул и исчезновение ядер в нейронах. При этом не было обнаружено признаков уменьшения количества гломерул в качестве адаптации к миниатюризации. Полученные выводы проливают свет на процессы масштабирования нейронных систем у насекомых и подчеркивают основной вызов оптимизации: тонкий баланс между размером органа и его функциональностью, который принципиально разными способами достигается в сенсорных органах насекомых и в антеннальных долях.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Некоммерческого Фонда развития науки и образования «Интеллект».

Библиография

- Anton, S., & Homberg, U. (1999). Antennal Lobe Structure. *Insect Olfaction*, 97–124. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07911-9_5
- Arnold, G., Masson, C., & Budharugsa, S. (1985). Comparative study of the antennal lobes and their afferent pathway in the worker bee and the drone (Apis mellifera). *Cell and Tissue Research*, 242(3), 593–605. https://doi.org/10.1007/BF00225425
- Berg, B. G., Galizia, C. G., Brandt, R., & Mustaparta, H. (2002). Digital atlases of the antennal lobe in two species of tobacco budworm moths, the oriental Helicoverpa assulta (male) and the American Heliothis virescens (male and female). *Journal of Comparative Neurology*, 446(2), 123–134. https://doi.org/10.1002/cne.10180
- Berger, D. R., Seung, H. S., & Lichtman, J. W. (2018). VAST (Volume Annotation and Segmentation Tool): Efficient Manual and Semi-Automatic Labeling of Large 3D Image Stacks. *Frontiers in Neural Circuits*, 12, 88. https://doi.org/10.3389/FNCIR.2018.00088
- Christensen, T. A., & Hildebrand, J. G. (1987). Male-specific, sex pheromone-selective projection neurons in the antennal lobes of the moth Manduca sexta. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 160(5), 553–569. https://doi.org/10.1007/BF00611929

- Couto, A., Arnold, G., Ai, H., & Sandoz, J. C. (2021). Interspecific variation of antennal lobe composition among four hornet species. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00280-z
- Desyatirkina, I. A., Makarova, A. A., Pang, S., Xu, C. S., Hess, H., & Polilov, A. A. (2023). Multiscale head anatomy of Megaphragma (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Arthropod Structure and Development*, 76, 101299. https://doi.org/10.1016/j.asd.2023.101299
- Diakova, A. V., Makarova, A. A., Pang, S., Xu, C. S., Hess, H., & Polilov, A. A. (2022). The 3D ultrastructure of the chordotonal organs in the antenna of a microwasp remains complex although simplified. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-022-24390-4
- Diakova, A. V., Makarova, A. A., & Polilov, A. A. (2018). Between extreme simplification and ideal optimization: antennal sensilla morphology of miniaturized *Megaphragma* wasps (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *PeerJ*, 6, e6005. https://doi.org/10.7717/peerj.6005
- Diakova, A. V, & Polilov, A. A. (2020). Sensation of the tiniest kind : the antennal sensilla of the smallest free-living insect Scydosella musawasensis (Coleoptera : Ptiliidae). 17. https://doi.org/10.7717/peerj.10401
- Diakova, A. V, & Polilov, A. A. (2021). Porous or non-porous? The challenge of studying unusual placoid sensilla of Megaphragma wasps (Hymenoptera, Trichogrammatidae) with electron microscopy. *Journal of Hymenoptera Research*, 84, 69–73. https://doi.org/10.3897/jhr.84.68707
- El Jundi, B., Huetteroth, W., Kurylas, A. E., & Schachtner, J. (2009). Anisometric brain dimorphism revisited: Implementation of a volumetric 3D standard brain in Manduca sexta. *Journal of Comparative Neurology*, *517*(2), 210–225. https://doi.org/10.1002/cne.22150
- Galizia, C. G., & Rössler, W. (2010). Parallel olfactory systems in insects: Anatomy and function. Annual Review of Entomology, 55, 399–420. https://doi.org/10.1146/annurevento-112408-085442
- Gao, Q., Yuan, B., & Chess, A. (2000). Convergent projections of Drosophila olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nature Neuroscience*, 3(8), 780–785. https://doi.org/10.1038/77680
- Grabe, V., Strutz, A., Baschwitz, A., Hansson, B. S., & Sachse, S. (2015). Digital in vivo 3D atlas of the antennal lobe of Drosophila melanogaster. *Journal of Comparative Neurology*, *523*(3), 530–544. https://doi.org/10.1002/cne.23697
- Kamikouchi, A., Inagaki, H. K., Effertz, T., Hendrich, O., Fiala, A., Göpfert, M. C., & Ito, K. (2009). The neural basis of Drosophila gravity-sensing and hearing. *Nature*, 458(7235), 165–171. https://doi.org/10.1038/nature07810
- Kazawa, T., Namiki, S., Fukushima, R., Terada, M., Soo, K., & Kanzaki, R. (2009). Constancy and variability of glomerular organization in the antennal lobe of the silkmoth. *Cell and Tissue Research*, 336(1), 119–136. https://doi.org/10.1007/s00441-009-0756-3
- Kelber, C., Rössler, W., & Kleineidam, C. J. (2010). Phenotypic plasticity in number of glomeruli and sensory innervation of the antennal lobe in leaf-cutting ant workers (A. vollenweideri). *Developmental Neurobiology*, 70(4), 222–234. https://doi.org/10.1002/dneu.20782

- Kleineidam, C. J., Obermayer, M., Halbich, W., & Rössler, W. (2005). A macroglomerulus in the antennal lobe of leaf-cutting ant workers and its possible functional significance. *Chemical Senses*, 30(5), 383–392. https://doi.org/10.1093/chemse/bji033
- Kristoffersen, L., Hansson, B. S., Anderbrant, O., & Larsson, M. C. (2008). Aglomerular hemipteran antennal lobes - Basic neuroanatomy of a small nose. *Chemical Senses*, 33(9), 771–778. https://doi.org/10.1093/chemse/bjn044
- Laissue, P. P., Reiter, C., Hiesinger, P. R., Halter, S., Fischbach, K. F., & Stocker, R. F. (1999). Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in Drosophila melanogaster. *Journal* of Comparative Neurology, 405(4), 543–552. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990322)405:4<543::AID-CNE7>3.0.CO;2-A
- Makarova, A. A., Diakova, A. A., Chaika, S. Y., & Polilov, A. A. (2022a). Scaling of the Sense Organs of Insects. 1. Introduction. Compound Eyes. *Entomological Review*, *102*(2), 161–181. https://doi.org/10.1134/S0013873822020026
- Makarova, A. A., Diakova, A. A., Chaika, S. Y., & Polilov, A. A. (2022b). Scaling of the Sense Organs of Insects. 2. Sensilla. Discussion. Conclusion. *Entomological Review*, 102(3), 323– 346. https://doi.org/10.1134/S0013873822030058
- Makarova, A. A., Meyer-Rochow, V. B., & Polilov, A. A. (2019). Morphology and scaling of compound eyes in the smallest beetles (Coleoptera: Ptiliidae). Arthropod Structure and Development, 48, 83–97. https://doi.org/10.1016/j.asd.2019.01.001
- Makarova, A. A., Veko, E. N., & Polilov, A. A. (2022). Metamorphosis and denucleation of the brain in the miniature wasp Megaphragma viggianii (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Arthropod Structure and Development*, 70. https://doi.org/10.1016/j.asd.2022.101200
- Makarova, A., Polilov, A., & Fischer, S. (2015). Comparative morphological analysis of compound eye miniaturization in minute hymenoptera. *Arthropod Structure and Development*, 44(1), 21–32. https://doi.org/10.1016/j.asd.2014.11.001
- Mares, S., Ash, L., & Gronenberg, W. (2005). Brain allometry in bumblebee and honey bee workers. *Brain, Behavior and Evolution*, 66(1), 50–61. https://doi.org/10.1159/000085047
- Mitchell, R. F., Hall, L. P., Reagel, P. F., McKenna, D. D., Baker, T. C., & Hildebrand, J. G. (2017). Odorant receptors and antennal lobe morphology offer a new approach to understanding olfaction in the Asian longhorned beetle. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 203(2), 99–109. https://doi.org/10.1007/s00359-016-1138-4
- Mockford, E. L. (1997). A new species of Dicopomorpha (hymenoptera: mymaridae) with diminutive, apterous males. *Annals of the Entomological Society of America*, 90(2), 115–120. https://doi.org/10.1093/aesa/90.2.115
- O'Donnell, S., & Bulova, S. (2017). Development and evolution of brain allometry in wasps (Vespidae): size, ecology and sociality. *Current Opinion in Insect Science*, 22, 54–61. https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.014
- Polilov, A. A. (2015). Small Is Beautiful: Features of the Smallest Insects and Limits to Miniaturization. Annual Review of Entomology, 60(1), 103–121. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020924

- Polilov, A. A., Makarova, A. A., Pang, S., Shan Xu, C., & Hess, H. (2021). Protocol for preparation of heterogeneous biological samples for 3D electron microscopy: a case study for insects. *Scientific Reports*, 11(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-021-83936-0
- Rebora, M., Dell'Otto, A., Rybak, J., Piersanti, S., Gaino, E., & Hansson, B. S. (2013). The antennal lobe of Libellula depressa (Odonata, Libellulidae). *Zoology*, 116(4), 205–214. https://doi.org/10.1016/j.zool.2013.04.001
- Robertson, H. M., & Wanner, K. W. (2006). The chemoreceptor superfamily in the honey bee, Apis mellifera: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research*, 16(11), 1395–1403. https://doi.org/10.1101/gr.5057506
- Roselino, A. C., Hrncir, M., Landim, C. da C., Giurfa, M., & Sandoz, J.-C. (2015). Sexual dimorphism and phenotypic plasticity in the antennal lobe of a stingless bee Melipona scutellaris. *Journal of Comparative Neurology*, 523(10), 1461–1473. https://doi.org/10.1002/cne
- Rospars, J. P. (1988). Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, *17*(3), 243–294. https://doi.org/10.1016/0020-7322(88)90041-4
- Rospars, J. P., & Hildebrand, J. G. (1992). Anatomical identification of glomeruli in the antennal lobes of the male sphinx moth Manduca sexta. *Cell & Tissue Research*, 270(2), 205–227. https://doi.org/10.1007/BF00328007
- Schachtner, J., Schmidt, M., & Homberg, U. (2005). Organization and evolutionary trends of primary olfactory brain centers in Tetraconata (Crustacea+Hexapoda). Arthropod Structure and Development, 34(3), 257–299. https://doi.org/10.1016/j.asd.2005.04.003
- Shankar, S., & McMeniman, C. J. (2020). An updated antennal lobe atlas for the yellow fever mosquito aedes aegypti. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 14, Issue 10). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008729
- Smid, H. M., Bleeker, M. A. K., Van Loon, J. J. A., & Vet, L. E. M. (2003). Three-dimensional organization of the glomeruli in the antennal lobe of the parasitoid wasps Cotesia glomerata and C. rubecula. *Cell and Tissue Research*, 312(2), 237–248. https://doi.org/10.1007/s00441-002-0659-z
- van der Woude, E., & Smid, H. M. (2016). How to escape from Haller's rule: Olfactory system complexity in small and large Trichogramma evanescens parasitic wasps. *Journal of Comparative Neurology*, 524(9), 1876–1891. https://doi.org/10.1002/cne.23927
- Vosshall, L. B., Wong, A. M., & Axel R. (2000). An Olfactory Sensory Map in the Fly Brain. *Cell*, 102, 147–159.
- Warton, D. I., Duursma, R. A., Falster, D. S., & Taskinen, S. (2012). smatr 3- an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(2), 257–259. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00153.x
- Winnington, A. P., Napper, K. M., & Mercer, A. R. (1996). Structural Plasticity of Identified Glomeruli in the Antennal Lobes of the Adult Worker Honey Bee. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* (Vol. 365).

- Xu, C. S., Hayworth, K. J., Lu, Z., Grob, P., Hassan, A. M., García-Cerdán, J. G., Niyogi, K. K., Nogales, E., Weinberg, R. J., & Hess, H. F. (2017). Enhanced FIB-SEM systems for largevolume 3D imaging. *ELife*, 6. https://doi.org/10.7554/ELIFE.25916
- Макарова, А. А. (2013). Особенности организации центральной нервной системы насекомых, обусловленные миниатюризацией [МГУ]. https://istina.msu.ru/dissertations/5548658/

Приложения:

Приложение 1 – данные, использованные в регрессионном анализе.

Приложение 2 – измерения числа и объемов гломерул, объемов антеннальных долей *у М. viggianii.*

Приложение 3 – параметры slope, elevation, p-значения корреляции и slope perрессионных анализов числа и объемов гломерул, объемов антеннальных долей у насекомых. N/A – недостаточно данных для анализа.