

На правах рукописи

ЯРОСЛАВЦЕВА
Ольга Николаевна

**ИММУННАЯ И ДЕТОКСИЦИРУЮЩАЯ СИСТЕМЫ НАСЕКОМЫХ ПРИ
РАЗВИТИИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МИКОЗОВ**

03.02.05 – энтомология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых Института систематики и экологии животных СО РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Глулов Виктор Вячеславович
(Институт систематики и экологии Животных СО РАН, г. Новосибирск)

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Штерншис Маргарита Владимировна
(Новосибирский государственный аграрный университет, г. Новосибирск)

кандидат биологических наук,
Алексеев Александр Анатольевич
(Институт химической кинетики и горения СО РАН, г. Новосибирск)

Ведущее учреждение: **Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск**

Защита состоится 28 февраля 2011 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 11.

Факс: (383) 217-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН.

Автореферат разослан __ января 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

 Л.В. Петрожицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. На популяционную динамику численности насекомых влияют различные факторы абиотической и биотической природы. Из биотических факторов существенную роль играют различные патогены. Среди последних можно выделить энтомопатогенные грибы, с которыми насекомые тесно контактируют в биоценозах. В процессе коэволюции у насекомых возник ряд защитных приспособлений, препятствующих или ограничивающих проникновение грибов и их развитие в организме хозяев.

Первым физическим и химическим барьером на пути проникновения грибов в организм насекомых является кутикула. На поверхности кутикулы, в эпикутикуле содержатся различные соединения (воска, жиры, жирные кислоты), препятствующие адгезии и росту грибов. Кроме того, в кутикуле насекомых присутствуют различные ферменты, способные предотвратить развитие грибов. В первую очередь, это ряд ферментов, объединенных в профенолоксидазный каскад, при активации которого запускается меланогенез. В результате этих ферментативных реакций образуется меланин, обладающий высокой прочностью, химической устойчивостью и способствующий локализации проникшего паразита. Кроме того, при меланогенезе образуются молекулы радикальной природы (семихиноны), которые являются токсичными для паразитов.

При развитии микоза в организме насекомых активизируются системы клеточного (фагоцитоз, инкапсуляция, гранулообразование) и гуморального (антимикробные белки, коагуляция, фенолоксидазы (ФО)) иммунитета. Одной из важных реакций иммунитета является инкапсуляция – процесс, при котором патоген заключается в капсулу, образуемую гемоцитами, с последующей меланизацией (Rosales, 2011). В организме насекомого грибы продуцируют ряд ферментов и токсинов, способных разрушать различные ткани и органы хозяев. В деградации и инактивации данных метаболитов грибов могут принимать участие детоксицирующие ферменты: глутатион-S-трансферазы, эстеразы и монооксигеназы (Серебров и др., 2003).

Анаморфный аскомицет *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin является одним из наиболее распространенных энтомопатогенных грибов. Он способен поражать сотни видов насекомых из разных отрядов. Кроме того, данный гриб активно используется во всем мире

для создания микоинсектицидных препаратов (Charnley, Collins, 2007; Wraight et al., 2007).

Восприимчивость насекомых к энтомопатогенным грибам зависит от ряда факторов. В первую очередь, это свойства самого патогена, определяющие его агрессивность (продукция ферментов, токсинов и др.). Во-вторых, это количество инфекционного начала, необходимое для успешного заражения насекомых. Перечисленные факторы могут влиять на характер микозов, которые протекают по-разному: от вялотекущих до быстроразвивающихся – с максимальной гибелью в первые несколько суток после заражения. При этом остается мало изученным вопрос о роли иммунной и детоксицирующей систем организма насекомого при развитии различных типов грибной инфекции.

Кроме того, на патогенез микозов может оказывать сильное влияние фоновая зараженность хозяев другими энтомопатогенами. Учитывая, что смешанные инфекции чрезвычайно широко распространены в природе, они могут существенно влиять на численность популяций хозяев. Исследования в этой области ранее проводились с целью создания комбинированных биопрепаратов (Bajan, Kmitowa, 1972; Lewis, Bing, 1991; Costa et al., 2001; Wraight, Ramos, 2005; Lednev et al. 2008; Mwamburi et al., 2009). Однако, защитные механизмы насекомых при смешанных инфекциях практически не изучены.

Успешное инфицирование насекомых энтомопатогенными грибами и дальнейшее развитие микоза зависит от абиотических факторов среды, в особенности от температуры и влажности (Vidal, Fargues, 2007). При этом оптимальные условия для развития патогена и насекомого могут не совпадать, что в свою очередь либо ускоряет, либо замедляет развитие микоза. Так, при оптимальных условиях, насекомые могут быть более устойчивы к инфекции вплоть до полного «выздоровления» (Blanford et al., 2000; Ouedraogo et al., 2004). Остается открытым вопрос о механизмах устойчивости насекомых к патогенам при различных гигротермических режимах.

Помимо биотических и абиотических условий значительное воздействие на течение микозов могут оказывать и различные антропогенные факторы. Начиная с середины XX века, исследователи обнаружили синергистическое действие между энтомопатогенными грибами и химическими инсектицидами (Теленга, 1956, 1963; Огарков, 1999; Павлюшин, 2000; Серебров и др., 2003, 2005; Delgado et al., 1999; Furlong, Groden, 2001). При этом остается малоизученным

вопрос о биохимических механизмах данных синергистических эффектов (Hiromori, Nishigaki, 2001).

Цель исследования – анализ параметров клеточного и гуморального иммунитета и активности ферментов детоксицирующей системы насекомых при различных типах микозов, вызванных *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok.

Задачи:

1. Оценить активность неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз у личинок азиатской саранчи *Locusta migratoria* при микозах, вызывающих различный уровень смертности;

2. Оценить активность неспецифических эстераз, глутатион-S-трансфераз и интенсивность инкапсуляции у личинок азиатской саранчи *L. migratoria* и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* при микозах, вызванных штаммами грибов с различным уровнем токсинообразования;

3. Оценить активность неспецифических эстераз, глутатион-S-трансфераз и интенсивность инкапсуляции у личинок колорадского жука *L. decemlineata* при смешанной бактериально-грибной инфекции, вызванной *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis* и *M. anisopliae*;

4. Оценить активность фенолоксидаз в кутикуле и интенсивность инкапсуляции у личинок большой вощиной огневки *Galleria mellonella* при развитии микозов в условиях оптимальных и субоптимальных для гусениц температур;

5. Оценить активность неспецифических эстераз, глутатион-S-трансфераз и интенсивность инкапсуляции у личинок колорадского жука *L. decemlineata* при обработке фосфорорганическим инсектицидом и заражении *M. anisopliae*.

Научная новизна. Впервые установлено, что экспрессия ферментов детоксицирующей системы в гемолимфе насекомых наблюдается только при заражении токсигенными штаммами *M. anisopliae*. Получены уникальные данные, свидетельствующие, что при сублетальном заражении личинок колорадского жука бактериями *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis* происходит снижение интенсивности инкапсуляции, а также подавление активности ферментов детоксицирующей системы, что в свою очередь может резко снижать устойчивость личинок к энтомопатогенным грибам и служить одной из причин синергизма при смешанных бактериально-грибных инфекциях. Впервые показано,

что при грибной инфекции, протекающей в условиях субоптимальных для *G. mellonella* температур, происходит снижение интенсивности инкапсуляции в гемолимфе и более поздняя активация фенолоксидазы в кутикуле, что может снижать устойчивость насекомых к энтомопатогенным грибам. Выявлено ингибирование неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз, а также снижение интенсивности инкапсуляции у личинок *L. decemlineata* на фоне низких доз фосфорорганического инсектицида, что может являться одной из причин синергистического действия энтомопатогенных грибов и химических инсектицидов.

Практическая значимость. Выявленные синергистические эффекты в динамике смертности насекомых при совместном инфицировании *M. anisopliae* и *B. thuringiensis*, а так же при совместной обработке *M. anisopliae* и фосфорорганическим инсектицидом, позволяют рекомендовать данные сочетания для дальнейшей разработки препаратов, используемых в регуляции численности насекомых – вредителей сельского и лесного хозяйства. Данные, полученные при изучении жизненных стратегий энтомопатогенных грибов, могут быть использованы для создания биопрепаратов с эпизоотийным и токсическим механизмами действия.

Апробации работы. Материалы, полученные в ходе исследований, представлены на IV Съезде Паразитологического общества РАН «Паразитология в XXI веке: проблемы, методы, решения» (Санкт-Петербург, 2008), международном симпозиуме «Биологический контроль инвазивных организмов» (Златибор, Сербия, 2009), III Межрегиональной научной конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока, посвященной 80-летию проф. К.П. Федорова (Новосибирск, 2009), Междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2010), VIII Межрегиональном совещании энтомологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2010), Международной научной конференции «Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке» (Санкт-Петербург, 2011) и межлабораторных семинарах ИСиЭЖ СО РАН (2009, 2011).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 13 научных работ, в том числе 10 статей в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста; состоит из введения, 3 глав,

заклучения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 21 рисунком. Список литературы включает 266 работ, из них 202 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает благодарность д.б.н., профессору В.В. Глупову (ИСиЭЖ СО РАН) за руководство научной работой, к.б.н. В.Ю. Крюкову и к.б.н. И.М. Дубовскому (ИСиЭЖ СО РАН) за помощь на всех этапах исследования, к.б.н. Н.А. Крюковой (ИСиЭЖ СО РАН) за ценные замечания, сделанные при работе с рукописью. За помощь в проведении экспериментальной работы я признательна всем сотрудникам лаборатории патологии насекомых (ИСиЭЖ СО РАН), сотрудникам лаборатории биотехнологии НИИЗиКР (г. Алматы), д.б.н. Г.В. Беньковской и Е.В. Суриной (ИБиГ УНЦ РАН, г. Уфа), к.б.н. Г.Р. Ледневу, к.б.н. М.В. Левченко, П.В. Митьковец (ВИЗР РАСХН, г. Санкт-Петербург), к.б.н. Е.А. Елисафенко (ИЦиГ СО РАН), а также сотрудникам Отдела прикладной энтомологии (Swansea University, Wales, Great Britain).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В литературном обзоре дана краткая историческая справка об исследованиях микозов насекомых. Охарактеризованы особенности биологии *M. anisopliae* и близких видов грибов, а также механизмы их «агрессии», развитие в кутикуле и полости тела хозяев. Описаны основные системы иммунитета насекомых, участвующие в защите против грибных инфекций. Проведен анализ работ по изучению влияния абиотических и биотических факторов среды на систему патоген-хозяин. Делается заключение о том, что для более глубокого понимания взаимодействий в данной системе необходимо изучение ответных механизмов организма насекомого на физиологическом, биохимическом и молекулярном уровне, с учетом различных факторов, влияющих на течение микозов.

Глава 2. Материалы и методы

Исследования проведены на личинках IV возраста колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae); личинках V возраста вощиной огневки *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae); личинках II возраста перелетной саранчи

Locusta migratoria L. (Orthoptera: Acrididae). Личинки колорадского жука и перелетной саранчи были собраны в Новосибирской области и Прибалхашье (Казахстан), соответственно. Личинки вощиной огневки были взяты из лабораторной популяции ИСиЭЖ СО РАН. Для исследований использовались штаммы энтомопатогенных грибов *M. anisopliae* из коллекции ИСиЭЖ СО РАН (штамм Р-72) и ВИЗР РАСХН (штамм МАК-1) и бактерии *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* (H8 ab) Bonnifoi & de Barjak var. *tenebrionis* Krieg et al. (штамм 2495) из коллекции микроорганизмов ИСиЭЖ СО РАН. Конидии грибов нарабатывали на дважды автоклавированном пшене, а спорокристаллическую биомассу бактерий – на мясопептонном агаре (Kryukov et al., 2009). Также в работе был использован фосфорорганический инсектицид пиримифос-метил (Актеллик, КЭ 500 г/л; Сингента Кроп Протекшн АГ, Австрия).

Для заражения грибами насекомых погружали в водную суспензию конидий на 10 сек. Для инфицирования бактериями проводили обработку корма спорокристаллической смесью *B. thuringiensis* с последующим скармливанием в течение 2 сут. Обработку инсектицидом проводили путем однократного погружения насекомых в водный раствор Актеллика с 10-секундной экспозицией. В контрольных вариантах корм обрабатывали дистиллированной водой. Учеты смертности проводили ежесуточно.

Интенсивность процессов инкапсуляции у насекомых оценивали по степени потемнения нейлоновых имплантантов (Dubovskiy et al., 2008, 2010, 2011). Приготовление образцов органов и тканей для измерения активности ферментов проводили по стандартным методикам (Dubovskiy et al., 2010; Дубовский и др., 2011). Активность неспецифических эстераз оценивали спектрофотометрически по образованию нитрофенила при длине волны 410 нм, по методу S.K. Prabhakaran et al. (1995) с изменениями (Dubovskiy et al., 2010, Дубовский и др., 2011). Активность глутатион-S-трансфераз (ГСТ) определяли спектрофотометрически по образованию 5-(2.4-динитрофенил)-глутатиона, при длине волны 340 нм, по методу В. Хабига (Habig et al., 1974) с изменениями (Dubovskiy et al., 2010; Дубовский и др., 2011). Фенолоксидазную активность в кутикуле насекомых определяли спектрофотометрически по образованию дофахрома (Ashida, Soderhall, 1984). Активность ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка. Концентрацию белка в образцах насекомых определяли по методу М. Бредфорда

(1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Данные проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA). Достоверность отличий определена с помощью критерия Фишера. Значения на графиках представлены в виде средних арифметических и их ошибок. Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро-Уилка (Statistica 6).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Активность ферментов детоксицирующей системы личинок *Locusta migratoria* при микозах, вызванных разными дозами инфекции *Metarhizium anisopliae*

При изучении влияния микозов на активность детоксицирующих ферментов было установлено, что ответ данной системы может зависеть от дозы патогена. Так, под действием низкой дозы гриба (итоговая смертность на 13 сут – 40% особей) происходило достоверное увеличение активности неспецифических эстераз на 3 и 6 сутки эксперимента (рис. 1 А). При летальном заражении (смертность 100% на 8 сут) в начальный период микоза было зарегистрировано резкое увеличение активности неспецифических эстераз и ГСТ в 2-3 раза, по сравнению с заражением низким титром и контролем (рис. 1 А, Б).

Отмеченное увеличение активности ферментов детоксицирующей системы при микозе согласуется с данными других исследователей (Серебров, 2000; Серебров и др., 2001, 2003, 2006; Zibae et al, 2009). При этом, зафиксированное нами дозозависимое увеличение активности неспецифических эстераз в начальный период микоза может свидетельствовать об участии данных ферментов в элиминации грибных метаболитов. Резкое увеличение активности неспецифических эстераз и ГСТ в начальный период развития летальной грибной инфекции свидетельствует о токсикозе, вызванном метаболитами гриба (Xia et al, 2000). При этом, последующее снижение активности данных ферментов до уровня контрольных значений в «острый» период заболевания на 6 сутки эксперимента (смертность более 80%) может быть связано с сильным подавлением защитных систем хозяина энтомопатогенными грибами. Полученные нами данные дополняют исследования (Gillespie et al.,

2000), в которых зарегистрировано снижение активности ряда показателей иммунитета саранчовых при микозе, вызванном *M. anisopliae*. Вероятно, токсикоз, вызванный грибной инфекцией, сопровождается общими нарушениями различных систем организма насекомого, приводящими к снижению активности ключевых звеньев иммунного ответа на фоне увеличения активности детоксицирующих ферментов.

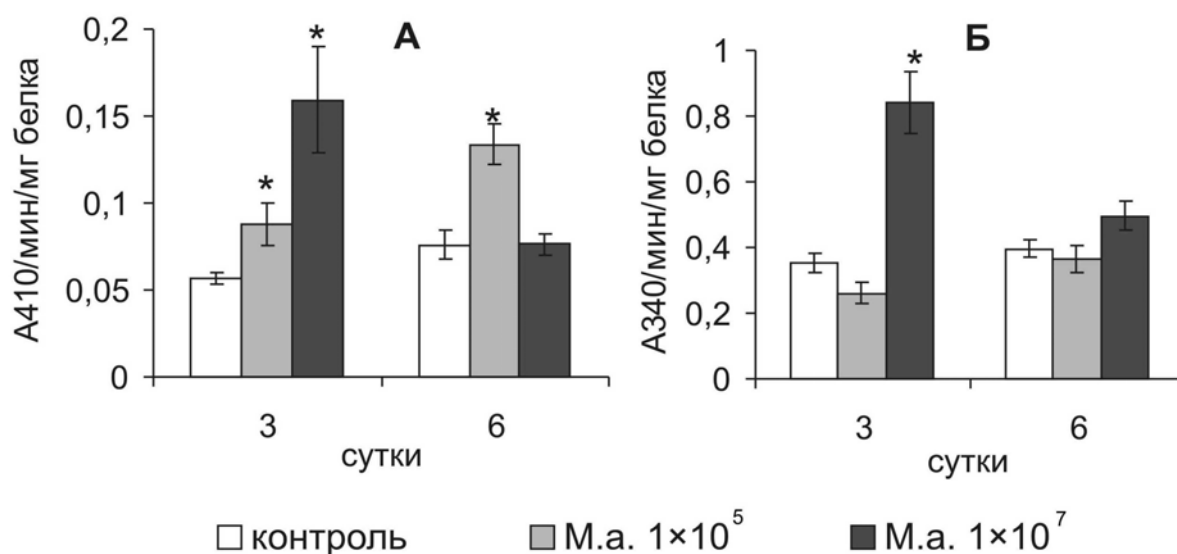


Рис. 1. Активность неспецифических эстераз (А) и глутатион-S-трансфераз (Б) в гомогенатах целого тела личинок *L. migratoria* при инфицировании двумя дозами *M. anisopliae* (М.а.) (* – $p < 0.05$ по сравнению с контролем).

3.2. Активность ферментов детоксицирующей системы и уровень инкапсуляции нейлоновых имплантантов в организме личинок *Leptinotarsa decemlineata* и *Locusta migratoria* при микозах, вызванных штаммами с различным уровнем токсинообразования

В природе насекомые могут сталкиваться со штаммами грибов, различающимися по своим свойствам, что может сказаться на особенностях развития патогенеза и ответных реакциях организма насекомого. Нами были проведены опыты по сравнению патогенезов *L. migratoria* и *L. decemlineata*, зараженных штаммами *M. anisopliae*, различающихся по уровню токсинообразования и жизненным стратегиям. Штамм Р-72 характеризовался стратегией токсина, а штамм МАК-1 – стратегией роста (Крюков и др., 2011). Повышенный

уровень продукции деструксинов (В, Е) у штамма Р-72 по сравнению с МАК-1 был установлен методом ВЭЖХ (Abdrahman et al., неопубликованные данные) и подтвержден в тесте с инъекциями культуральной жидкости штаммов личинкам *G. mellonella* (Крюков и др., 2011).

При заражении токсигенным штаммом (Р-72) время гибели 50% особей перелетной саранчи и колорадского жука наступало на 3-4 сут раньше, чем при инфицировании штаммом МАК-1. Однако, итоговая гибель насекомых достоверно не отличалась, составляя 90-100%. При этом штамм МАК-1 завершал свое развитие обильным конидиеобразованием на трупах, но при инфицировании штаммом Р-72 во всех случаях наблюдалась гибель гриба на стадии склероция.

У личинок колорадского жука под действием токсигенного штамма происходила активация ферментов детоксицирующей системы в начальный период микоза (3 сут эксперимента), но показатели активности данных ферментов при заражении ростовым штаммом не отличались от контроля (рис. 2). Сходные тенденции были обнаружены нами и при измерении этих ферментов в гомогенатах тела *L. migratoria*.

При анализе интенсивности инкапсуляции в гемолимфе насекомых было зафиксировано ее достоверное снижение (в 1.4 раза по сравнению с контролем) в варианте с заражением токсигенным штаммом на 3 и 6 сут, а в варианте с ростовым штаммом – только на 6 сут (в 1.5 раза по сравнению с контролем). Таким образом, при инфицировании токсигенным штаммом подавление клеточного иммунитета происходило на более ранних этапах микоза.

Результаты по токсигенным и патогенным свойствам исследованных штаммов *M. anisopliae* согласуются с данными, полученными М. Кершо с соавторами (Kershaw et al., 1999), показавшими тесную взаимосвязь между продукцией деструксинов и вирулентностью культур по отношению к жесткокрылым и чешуекрылым насекомым.

Повышенная активность детоксицирующих ферментов при заражении токсигенным штаммом, может быть следствием токсикоза на начальных этапах развития микоза. При этом отсутствие активации данной системы при инфицировании штаммом МАК-1, который имеет более низкий уровень токсинообразования, подтверждает его зоотрофные свойства (Wang et al., 2009).

Снижение интенсивности инкапсуляции при заражении токсигенным штаммом, сопоставимо с данными других

исследователей (Gillespie et al., 2000), показавшими снижение интенсивности процессов клеточного иммунитета при острых грибных инфекциях. Также рядом авторов показано подавление клеточного иммунитета насекомых при введении очищенных грибных токсинов и, в частности, деструксинов (Charnley, 2003).

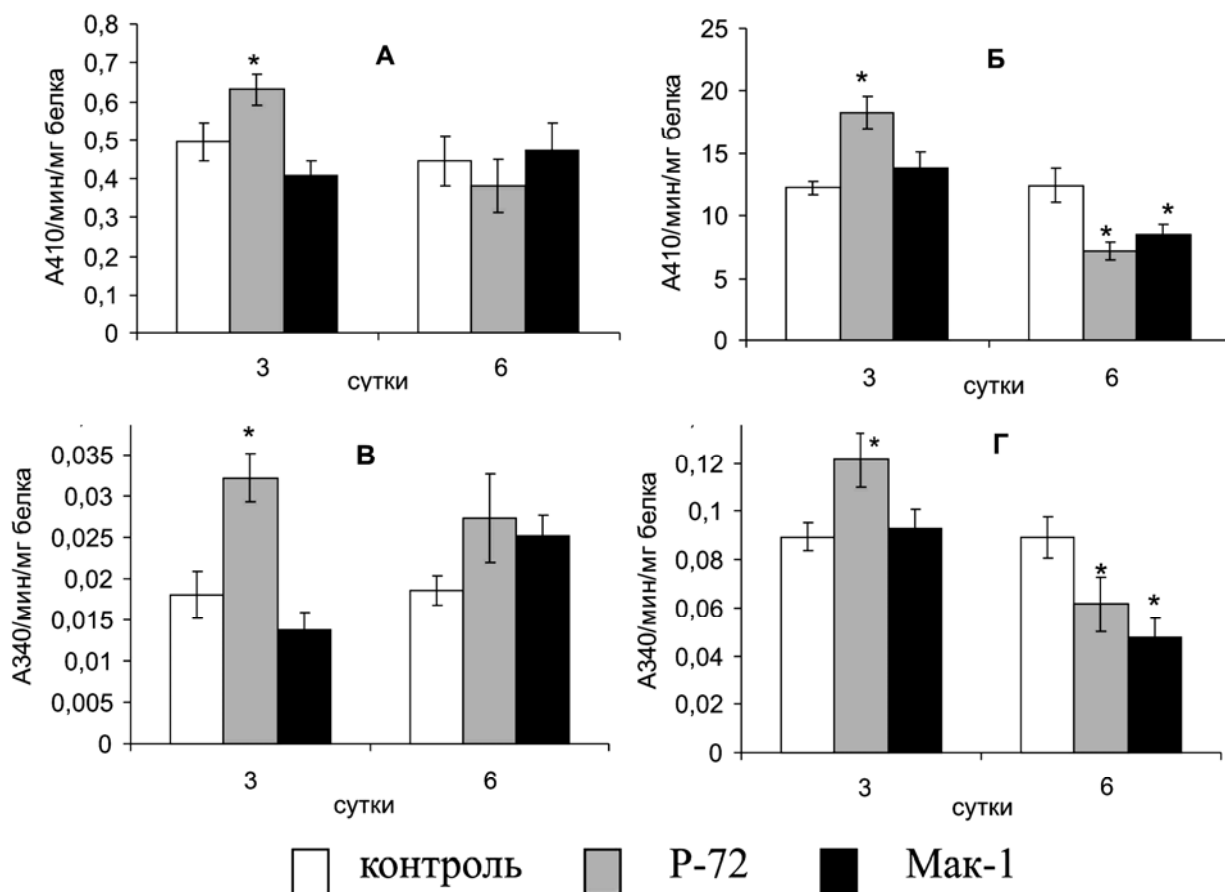


Рис. 2. Активность неспецифических эстераз в гемолимфе (А) и жировом теле (Б) и глутатион-S-трансфераз в гемолимфе (В) и жировом теле (Г) личинок *L. decemlineata* при инфицировании штаммами P-72 и Мак-1 *M. anisopliae* (титр 1×10^7 конидий/мл) ($*p < 0.05$ по сравнению с контролем).

Полученные результаты позволяют предположить, что при заражении насекомых токсигенным штаммом происходит выделение токсичных метаболитов грибов, «запускающих» детоксицирующую систему насекомых. Однако способность токсинов к подавлению клеточного иммунитета приводит к снижению устойчивости насекомых и быстрому развитию заболевания. При этом раннее истощение и быстрая гибель хозяина может приводить к значительному снижению репродуктивного потенциала патогена,

вплоть до полной невозможности формирования им дочерней инфекции.

3.3. Активность ферментов детоксицирующей системы и интенсивность инкапсуляции у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при смешанной бактериально-грибной инфекции, вызванной *Metarhizium anisopliae* и *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*

При микозе личинок колорадского жука, вызванным *M. anisopliae*, на фоне сублетального бактериоза *B. thuringiensis* был получен синергистический эффект в смертности насекомых. При смешанной инфекции гибель личинок через 8 сут после заражения составила 59%, тогда как в остальных вариантах («контроль», «*B. thuringiensis*» и «*M. anisopliae*») она не превышала 15–18%.

В начальный период микоза была зарегистрирована активация неспецифических эстераз и ГСТ в гемолимфе личинок колорадского жука (рис. 3). Однако под действием бактерий (монозаражение и смешанная инфекция) происходило либо подавление активности данных ферментов (в жировом теле), либо отсутствие данного увеличения (в лимфе). На 5 сут отмечено снижение активности детоксицирующих ферментов в жировом теле и гемолимфе насекомых во всех вариантах по сравнению с контролем. Исключение составила только активность ГСТ в гемолимфе, где достоверных отличий между вариантами эксперимента не было зарегистрировано. Таким образом, под действием бактерии наблюдалось подавление активности ферментов, направленных на защиту от грибного патогена.

При измерении интенсивности инкапсуляции нами было показано, что уже на первые сутки после заражения происходит 1.5–2-кратное достоверное ($p < 0.05$) снижение данного показателя в вариантах с монозаражением бактериями и смешанной инфекцией, по сравнению с контрольным вариантом и монозаражением грибом. Данная тенденция сохранялась и в последующие дни эксперимента.

Снижение интенсивности инкапсуляции в вариантах с заражением насекомых бактериями представляет значительный интерес. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей (Broderic et al., 2009, 2010), в которых было показано, что при бактериальной инфекции *B. thuringiensis* у непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. происходит уменьшение количества гемоцитов. Кроме того, мы регистрировали ухудшение питания и

снижение веса личинок колорадского жука под действием бактериальной и бактериально-грибной инфекции (Kryukov et al., 2009), что также могло приводить к снижению уровня ряда показателей иммунитета (Lee, et al., 2006).

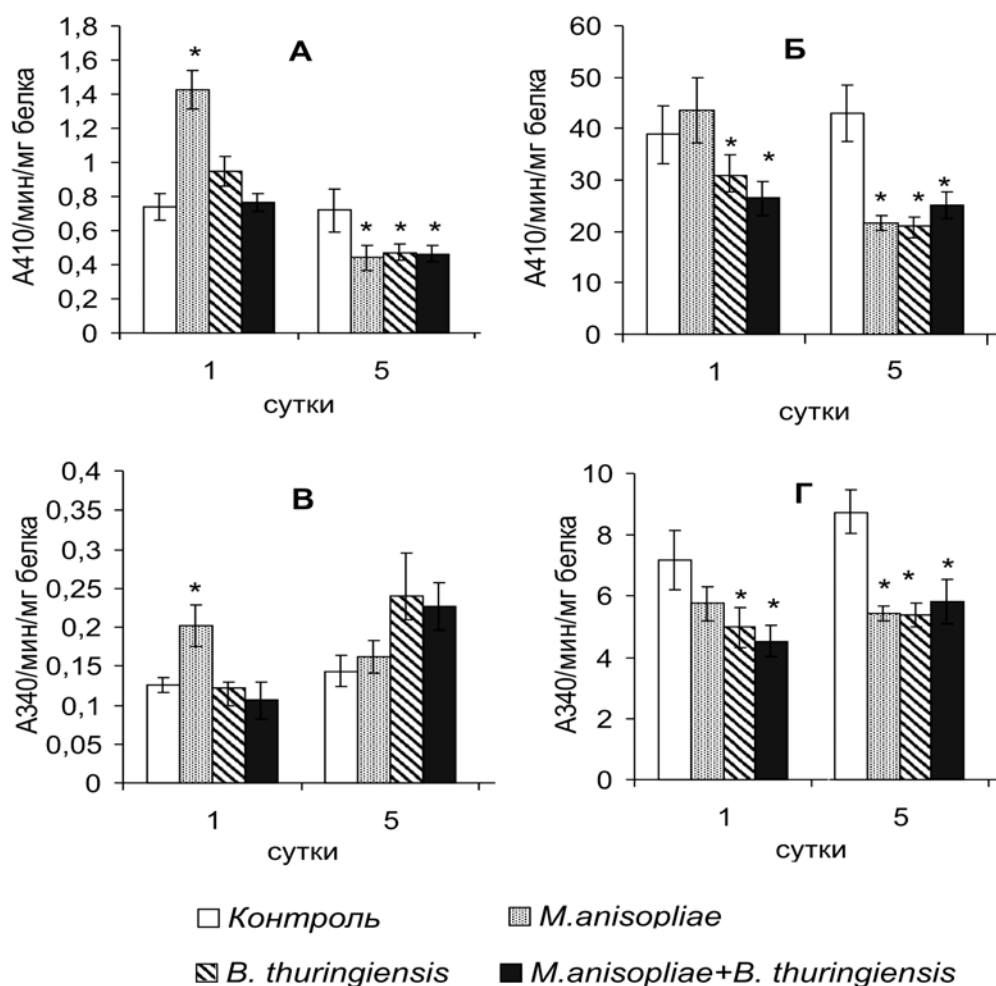


Рис. 3. Активность неспецифических эстераз в гемолимфе (А), жировом теле (Б) и глутатион-S-трансфераз в гемолимфе (В), жировом теле (Г) личинок *L. decemlineata* при инфицировании *M. anisopliae* (7×10^5 конидий/мл) и бактериями *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (1×10^6 кристаллов/мл) (* – $p < 0.05$ по сравнению с контролем).

Таким образом, мы предполагаем, что снижение интенсивности процесса инкапсуляции и активности ферментов детоксицирующей системы при бактериозе может приводить к снижению устойчивости насекомого к грибам, что, в свою очередь, приводит к ускоренной и более высокой гибели хозяев.

3.4. Активность фенолоксидазы в кутикуле и интенсивность инкапсуляции у личинок *Galleria mellonella* при микозах, протекающих в условиях разных температур

При изучении влияния различных температур на течение микоза и ответные механизмы насекомых нами было зафиксировано «выздоровление» личинок *G. mellonella* при температуре оптимальной для насекомых.

Так, при субоптимальной температуре для развития *G. mellonella*, но оптимальной для развития гриба (24°C) был отмечен высокий уровень смертности насекомых (95-100% на 9 сут опыта) в вариантах с двумя титрами гриба – 1×10^8 и 1×10^7 конидий/мл. При температуре 34°C, напротив, оптимальной для насекомых, и субоптимальной для гриба, смертность личинок от микоза отмечена только в варианте с высокой концентрацией конидий (1×10^8). Уровень смертности при этих условиях достиг 88% к 9 сут эксперимента. Однако, при пониженной дозе конидий гриба (1×10^7) смертность насекомых к концу эксперимента не превышала 16%.

При оптимальной для личинок температуре (34°C) нами зафиксировано раннее, выраженное увеличение активности ФО в ответ на развивающийся микоз (рис. 4). При этом снижение активности ФО при заражении грибом через 48 ч происходило именно в варианте с «выздоровлением» личинок.

Также было зафиксировано достоверное ($p \leq 0.05$) снижение интенсивности инкапсуляции начиная с 1 суток эксперимента (в 3 раза по сравнению с контролем) в условиях пониженной температуры при заражении высоким титром грибов. Причем в период развития наиболее острого микоза (2-е сут) интенсивность инкапсуляции снизилась до нулевых значений. При субоптимальной температуре для микопатогенов и оптимальной для насекомых (34°C) достоверных отличий в интенсивности инкапсуляции между вариантами не выявлено.

Зарегистрированный нами эффект «выздоровления» насекомых при повышении температуры согласуется с данными других авторов, полученными на саранчовых (Inglis, et al. 1997; Blanford, Thomas, 1999; Blanford, et al., 2000; Ouedraogo et al., 2004) и медоносных пчелах (Starks et al., 2000). Предполагается, что увеличение устойчивости насекомых к грибам при повышенной температуре связано с субоптимальными абиотическими условиями

для роста патогена и/или ускорением метаболизма насекомого-хозяина (Thomas, 2003).

Отмеченное нами снижение интенсивности процесса инкапсуляции в варианте с заражением высокой дозой гриба и содержании при 24°C, свидетельствует об остром грибном патогенезе. Сходные тенденции, были отмечены при изучении клеточного иммунитета на кокцидах (Blumberg et al., 1991) и саранчовых (Ouedraogo, et al., 2003).

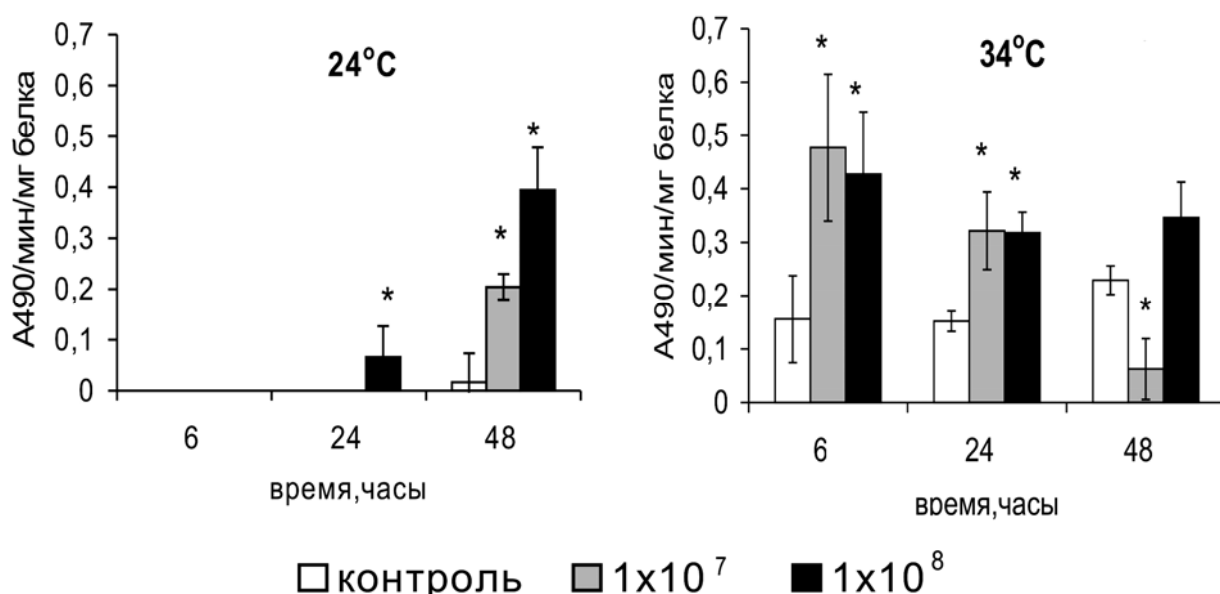


Рис. 4. Фенолоксидазная активность в кутикуле личинок *G. mellonella* при инфицировании двумя дозами *M. anisopliae* и содержании при различных температурах (* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем).

Таким образом, можно предположить, что субоптимальные температуры не позволяют насекомым в полной мере активировать защитные системы организма и противостоять патогену. В свою очередь, условия оптимальные для микопатогена позволяют ему развиваться и колонизировать хозяина в короткий период времени.

3.5. Активность ферментов детоксицирующей системы и интенсивность инкапсуляции у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при совместной обработке фосфорорганическим инсектицидом и заражении *Metarhizim anisopliae*

При совместной обработке личинок колорадского жука инсектицидом (Актеллик, пермифос-метил) и конидиями гриба наблюдался синергистический эффект в смертности насекомых. На 7 сут эксперимента смертность при смешанной обработке составила 67%, тогда как в остальных вариантах не превышала 24%. При этом было зарегистрировано подавление активности детоксицирующих ферментов и подавление интенсивности инкапсуляции под действием инсектицида в варианте с совместной обработкой грибом и инсектицидом. Так, при микозе было установлено повышение активности неспецифических эстераз и ГСТ на 2 и/или 5 сутки после заражения по сравнению с контролем (рис. 5). Тогда как, при добавлении инсектицида наблюдалось либо отсутствие увеличения активности (рис. 5 Б), либо ее задержка (рис. 5 А).

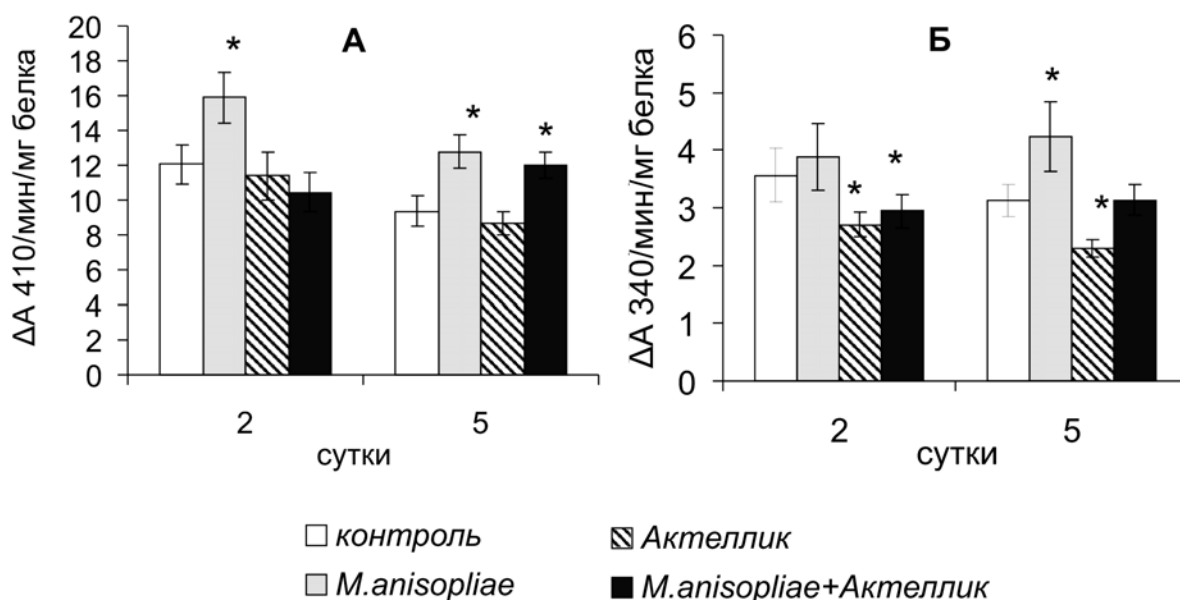


Рис. 5. Активность неспецифических эстераз (А) и глутатион-S-трансфераз (Б) в жировом теле личинок *L. decemlineata* при заражении энтомопатогенным грибом *M. anisopliae* (1×10^6 конидий/мл) и обработке Актелликом (0,0001% д.в.) (* – $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем).

При измерении интенсивности инкапсуляции, у личинок колорадского жука, было установлено достоверное снижение данного процесса в вариантах с заражением микопатогеном по сравнению с контролем (рис. 6). При этом в варианте *M. anisopliae* + Актеллик в начальный период наблюдалось резкое 2-3 кратное снижение инкапсуляции по сравнению с остальными вариантами.

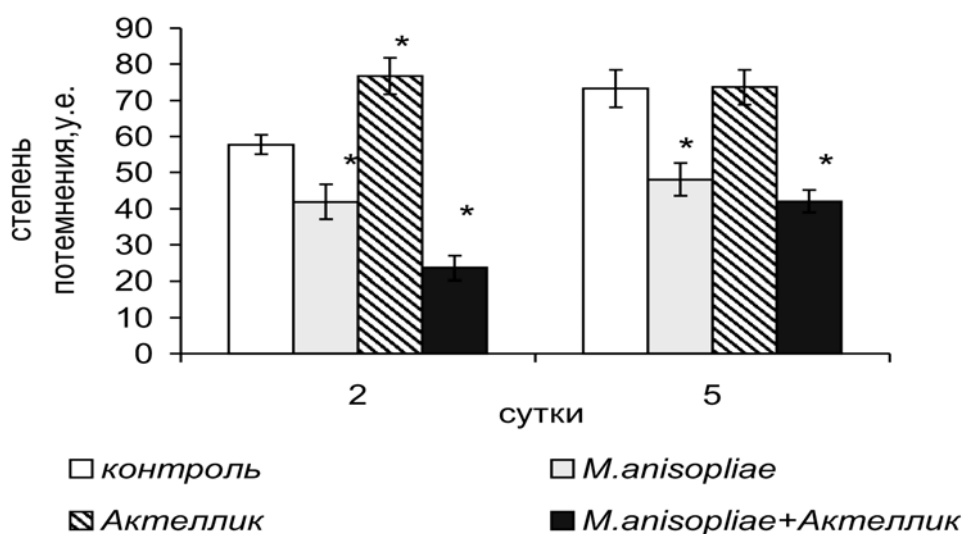


Рис 6. Интенсивность процесса инкапсуляции у личинок *Leptinotarsa decemlineata* при заражении энтомопатогенным грибом *M. anisopliae* (1×10^6 конидий/мл) и обработке Актелликом (0,0001% д.в.) (*– $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем).

Отсутствие активации детоксицирующих ферментов при совместном заражении грибом и обработке инсектицидом, возможно, связано с подавлением фосфорорганическим соединением (ФОС) активности данных ферментов. Вероятно, ФОС может блокировать активацию компонентов детоксицирующей системы колорадского жука в жировом теле при развитии микозов, что может повышать чувствительность насекомых к токсичным метаболитам, образующимся при грибном патогенезе. Это согласуется с исследованием В.В. Сереброва с соавторами (2003), в котором при совместной обработке личинок *Huynomeuta evonymellus* (L.) ФОС и заражении *M. anisopliae* было показано снижение количества и активности изоформ неспецифических эстераз.

Ранее исследователи (Hiromori, Nishigaki, 2001) установили снижение фенолоксидазной активности и количества гранулоцитов у *Anomala cuprea* Норе при воздействии ФОС. Авторы предполагают, что ФОС обладают иммуносупрессивным действием, что может снижать устойчивость по отношению к грибам и приводить к возникновению эффекта синергизма.

Таким образом, при микозе, вызванном *M. anisopliae* на фоне низких доз фосфорорганического инсектицида у личинок колорадского жука отмечалось ингибирование активности ферментов детоксицирующей системы (неспецифических эстераз и ГСТ),

экспрессия которых наблюдается при микозах. В тоже время, совместное действие патогена и инсектицида приводило к значительному снижению уровня инкапсуляции у личинок, по сравнению с монозаражением *M. anisopliae*. Ингибирование инсектицидом систем, ответственных за устойчивость насекомых к грибным инфекциям, вероятно, является одной из причин синергизма патогена и химического инсектицида.

Заключение

При проникновении гриба в организм насекомого-хозяина патоген продуцирует ряд метаболитов (ферментов и токсинов), необходимых для успешной колонизации хозяина (Charnley, 2003). При этом в ответ на проникновение патогена в организме насекомого могут запускаться различные защитные механизмы, в том числе и детоксицирующая система, которая направлена на инактивацию и детоксикацию токсичных веществ. Показана активация ферментов детоксицирующей системы, а также изменение количества изоформ данных ферментов при микозах насекомых (Серебров и др., 2001, 2006; Zibae et al., 2009). Однако, полученные нами данные свидетельствуют, что активация данных ферментов при микозах зависит от ряда факторов. В первую очередь, это свойства самого патогена и количество инфекционного начала. Так, установленная нами резкая активация ферментов детоксицирующей системы у *L. migratoria* при грибной инфекции, вызванной высокой дозой патогена и менее выраженный ответ при низких дозах, свидетельствует о различном дозозависимом ответе данной защитной системы. Кроме того, ферменты детоксицирующей системы по-разному активируются при микозах, вызванных патогенами с различными вирулентными свойствами. Так, при инфицировании штаммом гриба с повышенным уровнем токсинообразования происходит активация неспецифических эстераз и ГСТ, чего не наблюдается при заражении менее токсигенным штаммом. Кроме того, нами показано, что на защитные реакции насекомых при микозе могут оказывать влияние и другие факторы. В частности, при микозе у личинок колорадского жука под действием сопутствующих инфекций (*Bacillus thuringiensis*) нами показано подавление активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз, что вероятно, не позволяет организму насекомого «справиться» с заболеванием, и приводит к ускоренной гибели. Сходное

ингибирующее действие на ферменты детоксицирующей системы могут оказывать и химические инсектициды.

Кроме того, мы установили, что на успешность заражения и дальнейшее развитие микозов влияет температура окружающей среды. Нами впервые показано, что оптимальные для развития личинок *G. mellonella* температуры позволяют активировать защитные механизмы на самых ранних этапах заражения и «справиться» с грибной инфекцией. Установлена повышенная активация ФО в кутикуле при оптимальных для *G. mellonella* температурах (34°C), чего не наблюдалось при субоптимальных (24°C). Повышенные температуры могут отрицательно влиять на рост и развитие микопатогена, что в совокупности с «усиленной» работой защитных систем насекомых приводит к «выздоровлению» хозяев.

Одной из важных защитных систем насекомых является система клеточного иммунитета. Данная система направлена на элиминацию уже проникших профагул патогена. Рядом исследователей показано подавляющее действие токсических метаболитов энтомопатогенных грибов на клеточный иммунитет насекомых, как при развитии микозов, так и при действии очищенных токсинов (Vilcinskas, 1997; Vandani, 2008). Нами также в большинстве случаев было зарегистрировано снижение интенсивности процесса инкапсуляции при микозах. При этом под действием штамма с повышенным уровнем токсинообразования происходило более раннее и продолжительное подавление данного процесса. Кроме того, нами установлено, что при развитии микозов под влиянием фонового заражения бактериями, обработке фосфорорганическими инсектицидами или под действием субоптимальных для хозяев температур происходит значительное подавление данного показателя клеточного иммунитета. Это, в свою очередь, приводит к повышению чувствительности насекомых к микопатогену, быстрому развитию грибной инфекции и гибели хозяев в более ранние сроки.

Таким образом, на течение и исход грибного заболевания у насекомых влияет ряд факторов: доза патогена и его вирулентные свойства, наличие сопутствующих инфекций, субоптимальные температурные условия для развития хозяев, воздействие инсектицидов. Все это вызывает подавление активности детоксицирующих ферментов, снижение интенсивности клеточного иммунитета и (или) активности фенолоксидазы, т.е. систем, ответственных за устойчивость насекомых к микопатогену. Это, в свою очередь, может приводить к увеличению количества

зараженных особей, ускорению гибели насекомых от микоза, и как следствие, существенно влиять на динамику численности популяций насекомых и их патогенов.

Выводы

1. Развитие острой грибной инфекции, вызванной *Metarhizium anisopliae*, приводит к активации неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз в гомогенате тела личинок *Locusta migratoria*.

2. Микоз, вызванный токсигенным штаммом *M. anisopliae*, приводит к увеличению активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз в гомогенатах тела личинок *L. migratoria*, гемолимфе и жировом теле личинок *Leptinotarsa decemlineata*, а также к раннему снижению интенсивности инкапсуляции у личинок *L. decemlineata*. Данных эффектов не наблюдается при инфицировании насекомых штаммом со стратегией роста.

3. Совместное инфицирование грибами *M. anisopliae* и бактериями *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis* личинок *L. decemlineata* приводит к синергистическому эффекту в смертности насекомых. При бактериозе и при смешанной инфекции происходит подавление систем, участвующих в защите насекомых от грибной инфекции: интенсивности инкапсуляции, активности ферментов детоксицирующей системы.

4. Грибная инфекция, вызванная *M. anisopliae*, протекающая при субоптимальной пониженной температуре для личинок *Galleria mellonella* (24°C), приводит к более поздней активации фенолоксидазы в кутикуле насекомых, а также снижению интенсивности инкапсуляции по сравнению с оптимальной для насекомых температурой (34°C).

5. При микозе, протекающем на фоне низких доз фосфорорганического инсектицида «Актеллик», у личинок *L. decemlineata* отмечается снижение активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз и значительное снижение уровня инкапсуляции, по сравнению с монозаражением *M. anisopliae*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Крюков В. Ю., Мартемьянов В. В., Половинка М. П., Лузина О. А., Дубовский И. М., Серебров В. В., Ходырев В. П., Малярчук А. А., Гербер О. Н., Ярославцева О. Н., Боярищева Е. А., Левченко М. В.,

Глулов В. В., Салахутдинов Н. Ф., Толстикова Г. А. Усниновая кислота – перспективный синергист для биопрепаратов на основе энтомопатогенных микроорганизмов // Доклады академии наук. 2008. Т. 423. № 2. С. 279-282.

2. Крюков В. Ю., Ходырев В. П., Ярославцева О. Н., Каменова А. С. Дуйсембеков Б. А., Глулов В. В. Синергетическое действие энтомопатогенных гифомицетов и бактерий *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* при инфицировании личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* // Прик. биохим. и микробиол. 2009. Т. 45. № 5. С. 571-576.

3. Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Левченко М. В., Леднев Г. Р., Глулов В. В. Фенотипическая изменчивость природных изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. Вып. 6. С. 514-521.

4. Ярославцева О. Н., Дубовский И. М., Крюков В. Ю., Ходырев В. П., Глулов В. В. Активность реакций клеточного иммунитета и компонентов детоксицирующей системы у личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* при развитии смешанной инфекции, вызванной грибом *Metarhizium anisopliae* и бактерией *Bacillus thuringiensis* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 1 С. 142-143.

5. Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Леднев Г. Р., Борисов Б. А. Локальные эпизоотии, вызванные телеоморфными кордиципитоидными грибами (Ascomycota: Нуростреалес) в популяциях лесных чешуекрылых и пилильщиков летне-осеннего комплекса в Сибири // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. Вып. 4. С. 315-328.

6. Половинко Г. П., Ярославцева О. Н., Тешебаева З. А., Крюков В. Ю. Доминирующие виды энтомофильных анаморфных аскомицетов Западной Сибири, Приморья и Киргизии // Сиб. экол. журн. 2010. № 5. С. 709-716.

7. Крюков В. Ю., Леднев Г. Р., Левченко М. В., Ярославцева О. Н., Макаров Е. М., Баймагамбетов Е. Ж., Дуйсембеков Б. А., Глулов В. В. Влияние различных наполнителей на биологическую эффективность энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* против саранчовых в условиях Казахстана // Агрехимия. 2010. № 12. С. 26-30.

8. Dubovskiy I. M., Kryukov V. Yu., Benkovskaya G. V., Yaroslavtseva O. N., Surina E. V., Glupov V. V. Activity of detoxificative enzymes system and encapsulation rate in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* larvae under organophosphorus insecticide treatment and entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* infection // Euroasian Entomol. J. 2010. Vol. 9. № 4. P. 577-582.

9. Крюков В. Ю., Дубовский И. М., Ярославцева О. Н., Левченко М. В., Слямова Н. Д., Белгибаева А. Б., Ходырев В. П., Леднев Г. Р., Глулов В. В. Сравнительный анализ двух штаммов энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* с разными жизненными стратегиями // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45. Вып. 2. С. 164-176.

10. Дубовский И. М., Слямова Н. Д., Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Левченко М. В., Белгибаева А. Б., Адилханкызы А., Глупов В. В. Активность неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз у личинок азиатской саранчи *Locusta migratoria* при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae* // Зоол. журн. 2011. Т. 90. №11. С. 1360-1364.

Материалы конференций:

1. Ярославцева О. Н., Крюков В. Ю. Локальная эпизоотия *Cordyceps militaris* в Западной Сибири // Материалы V Всероссийского съезда паразитологического общества при российской академии наук «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения» СПб. 2008. Т.3. С. 245-246.

2. Ярославцева О. Н., Крюков В. Ю., Левченко М. В., Леднев Г. Р., Ходырев В. П., Глупов В. В. Синергизм грибных и бактериальных патогенов при смешанных инфекциях у массовых саранчовых и колорадского жука // Материалы международного симпозиума «Биологический контроль инвазивных организмов». Сербия, Златибор. 2009. С. 64-65.

3. Ярославцева О. Н., Дубовский И. М., Крюков В. Ю., Левченко М. В., Барашкова П. В., Глупов В. В. Изменение физиологических и биохимических параметров организма насекомых при микозах, вызываемых грибами *Beauveria bassiana* и *Metharhizium anisopliae* // Материалы международной научной конференции «Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке». СПб: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 2011. С.182.