

УДК 632.951.2

СКРИНИНГ МОДИФИКАНТОВ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ СИНЕРГИСТОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA* ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЧИСЛЕННОСТИ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА*

© 2012 г. В.Ю. Крюков¹, О.А. Лузина², О.Н. Ярославцева¹,
М.П. Половинка², Н.Ф. Салахутдинов², В.В. Глупов¹

¹Институт систематики и экологии животных СО РАН
630091 Новосибирск, ул. Фрунзе, 11, Россия

²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
630090 Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 9, Россия
E-mail: krukoff@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.2011 г.

Протестированы химические модификанты (R)- и (S)-усниновых кислот в качестве возможных синергистов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. при инфицировании им личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. Большинство модификантов в концентрации 0.05% не вызвали повышения восприимчивости личинок к грибу либо показали невысокое (15–35%) увеличение уровня смертности. Наибольшее и стабильное повышение смертности (50%) вызвали полифторсодержащие производные, полученные в реакции (S)-усниновой кислоты с гексафторпропеном. Установлены концентрации данных соединений и титры конидий гриба, приводящие к синергистическому эффекту в смертности насекомых в лабораторных и полевых условиях. Показаны антифидантные свойства полифторсодержащих производных для личинок колорадского жука. *Ключевые слова:* скрининг, модификанты, усниновая кислота, синергизм, энтомопатогенный гриб *Beauveria bassiana*, регуляция численности, колорадский жук.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка методов регуляции численности колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. с помощью энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. интенсивно ведется, начиная с середины XX века [1, 2]. Однако применение препаратов на основе этого патогена встречает ряд трудностей, связанных с нестабильностью их действия, а также длительным латентным периодом микоза, за время которого насекомые успевают нанести значительные повреждения растениям [3]. Повышения биологической эффективности микоинсектицидов, а также сокращения латентного периода инфекции можно добиться путем применения смесей энтомопатогенов [2, 4, 5] или совместного использования грибов и химических инсектицидов [6–9]. Также некоторые метаболиты растений могут обладать антагонистическими свойствами по отношению к насекомым и увеличивать восприимчивость

последних к энтомопатогенам [10]. В частности, энтомоцидными свойствами может обладать вторичный метаболит лишайников – усниновая кислота (2,6-диацетил-7,9-гидрокси-8,9b-диметил-1,3-(2H,9bH)-добензо-фурандион) [11–15]. В одной из предыдущих работ авторов [12] было показано, что данный метаболит может выступать в качестве синергиста энтомопатогенных грибов и вирусов при инфицировании ими некоторых видов жесткокрылых и чешуекрылых насекомых. Учитывая обнаруженную биологическую активность усниновой кислоты и относительно простые методы выделения ее оптически чистых изомеров из растительного сырья [16], представлялось целесообразным протестировать ряд ее производных как потенциальных синергистов энтомопатогенных грибов.

Цель работы – скрининг разнообразных производных (R)- и (S)-изомеров усниновой кислоты в качестве возможных синергистов энтомопатогенного гриба *B. bassiana* и оценка возможности применения наиболее перспективных форм в полевых условиях против личинок колорадского жука.

* Работа поддержана фондами Президиума СО РАН и Президента РФ МК-2372.2011.4.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использован природный изолят *B. bassiana* (Сар-31), выделенный из трупов саранчовых в Новосибирской обл. Конидиальную массу гриба нарабатывали на дважды автоклавированном пшене с последующей сушкой и перемалыванием [17, 18]. Титр конидий определяли методом серийных разведений и посевом на агаризованную среду Чапека [19].

Модификанты усниновой кислоты (МУК) получали на основе реакций взаимодействия (R)- и (S)-усниновых кислот с 1 или 2 М первичных алифатических и ароматических аминов [20] и 1 или 2 М замещенных фенилгидразинов [21], реакцией конденсации карбонильной группы (R)- и (S)-усниновых кислот с аминогруппой глицина [22], а также реакцией О-алкилирования (S)-усниновой кислоты гексафторпропенем (таблица).

Биотестирование проводили на личинках 3-го возраста колорадского жука. Для приготовления тестируемых образцов 10 мг МУК растворяли в 1 мл ацетона, затем добавляли в 19 мл суспензии конидий гриба или воды и резко встряхивали. В контрольные варианты (обработка водой, суспензиями конидий) добавляли соответствующее количество ацетона. Тестируемых личинок и листья картофеля погружали в суспензии на 10 сек и затем просушивали в течение 15 мин при 27–30°C. Личинок содержали в пластиковых контейнерах объемом 700 мл, накрытых сверху сеткой. Смену корма проводили на 2-е сут после обработки и далее каждые сутки. С целью предотвращения высыхания листьев, их черешки помещали в пробирки Эппендорф (1.5 мл), тампонируемые влажной ватой. В полевом эксперименте растения и насекомых обрабатывали ручным пульверизатором до появления стекающих капель. Для точного учета смертности личинок по 15 экз. содержали в садках из сетки, надетых на побеги картофеля.

Первичный скрининг МУК проводили, используя следующие варианты эксперимента: *B. bassiana*, *B. bassiana* + МУК, контроль (обработка водой с ацетоном). Титр гриба составлял 1×10^7 конидий/мл, концентрация МУК – 0.05%. В каждом варианте было 3 повторности по 10 личинок в каждой. Показавший высокую эффективность модификант тестировали по схеме “*B. bassiana*, МУК, *B. bassiana* + МУК, контроль”, при этом титры конидий и концентрацию МУК изменяли в зависимости от уровня смертности в предыдущих экспериментах и условий опыта (лабораторный или полевой). Повторность опыта – четырехкратная, по 10–15 личинок в каждой.

При изучении репеллентных и антифидантных свойств МУК листья картофеля обрабатывали их раствором (0.03%) либо водой с ацетоном. Листья, обработанные и не обработанные МУК, располагали с 2-х сторон чашек Петри. Личинок помещали в центр чашки и ставили в термостат для исключения влияния фототаксиса. Через 1 сут подсчитывали количество личинок, питающихся на обработанных и необработанных МУК листьях, а также площадь прогрызов на листьях картофеля. Соотношение прогрызов и общей площади листовой поверхности устанавливали с помощью миллиметровой палетки и выражали в процентах. Повторность опытов четырехкратная, по 10 личинок в каждой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первичный скрининг МУК показал, что большинство из 35 полученных модификантов как (R)-, так и (S)-производных усниновой кислоты не вызвало достоверного увеличения уровня смертности личинок по сравнению с монозаражением *B. bassiana* (смертность на уровне 40%). Введение в структуру молекулы усниновой кислоты енаминового (модификанты 3–5, 7–10, 12–16, 19, 20) и енаминокислотного (модификанты 21, 22) фрагментов в большинстве случаев не повысило показатели тестируемой активности. Практически все исследованные пиразольные производные усниновой кислоты (модификанты 23, 25, 27, 29, 31, 33), а также содержащие дополнительный гидразиновый фрагмент (модификанты 24, 28, 30, 32, 34) не вызвали достоверного повышения уровня смертности личинок. Небольшое, но статистически значимое увеличение смертности (15–35%, $P < 0.05$) наблюдали при обработке модификантами 2, 6, 11, 17, 18, 26 (рис. 1). Следует отметить, что все они относились к разным типам производных. Другие соединения с подобными структурами молекул не вызвали увеличения смертности личинок. Отметим, что только в 2-х случаях (модификанты 1 и 2, 5 и 6) (R)-энантиомер проявил большую, чем соответствующий (S)-изомер, энтомоцидную активность.

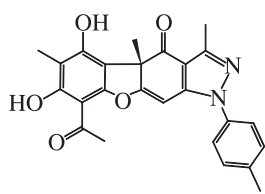
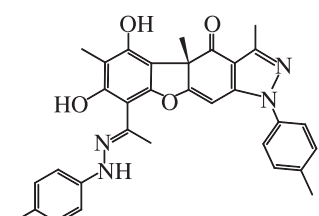
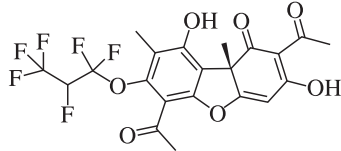
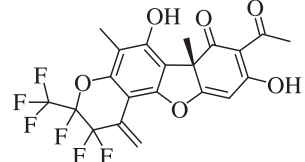
Наибольшее достоверное увеличение уровня смертности личинок вызвала смесь полифторсодержащих производных усниновой кислоты (модификант 35а + 35б), полученная в реакции (S)-усниновой кислоты 1 с гексафторпропенем.

В последующих экспериментах установлено, что данная композиция в концентрации 0.05% обладала собственным энтомоцидным действием (смертность личинок на уровне 80–90%), т. е. без

Структура химических модификантов усниновой кислоты

№	Структурная формула	№	Структурная формула
1		2	
3		4	
5		6	
7		8	
9		10	
11		12	
13		14	
15		16	
17		18	

№	Структурная формула	№	Структурная формула
19		20	
21		22	
23		24	
25		26	
27		28	
29		30	
31		32	

№	Структурная формула	№	Структурная формула
33		34	
35a		35б	

ее комбинирования с грибом. При скармливании личинкам данной смеси наблюдали отчетливые признаки токсикоза насекомых: потерю тургора тела, потемнение окраски, замедление роста, задержку окукливания выживших личинок на 5–10 сут.

При хроматографическом изучении модификанта 35 было обнаружено, что наряду с основным компонентом 35а – продуктом О-алкилирования перфторпропеном по 7-му фенольному гидроксилу усниновой кислоты, в смеси присутствовал в меньших количествах также продукт С-алкилирования и последующей внутримолекулярной циклизации – минорный компонент 35б, представляющий собой соединение с аннелированным фторсодержащим пирановым циклом. При выделении компонентов в индивидуальном виде авторы столкнулись с трудностями их хроматографического разделения: для выделения химически чистых фракций понадобилось проводить неоднократную очистку с использованием силикагеля в соотношении 300 : 1 и большого количества элюента. В итоге соединения 35а и 35б были выделены в индивидуальном виде с выходами 55 и 22% соответственно. Каждое из этих соединений было протестировано на личинках колорадского жука (обработка как листьев картофеля, так и насекомых) и было показано, что оба соединения обладают инсектицидной активностью: $СК_{50}$ для 35а составила 0.021% (95%-ный доверительный интервал – 0.016–0.027%), $СК_{50}$ для минорного компонента 35б – 0.014% (0.010–0.017%). В обоих случаях авторы отмечали задержку роста и окукливания личинок. На основании данных об инсектицидном действии смеси 35, сравнимом с активностью ее отдельных компонентов, а также вследствие нерентабельности

многократного хроматографического разделения этих соединений, авторами предложено соединения 35а и 35б не выделять, а полученную в реакции (S)-усниновой кислоты с перфторпропеном смесь соединений использовать как композицию (МУК 35).

Лабораторные эксперименты с комбинированием концентраций МУК 35 и титров конидий гриба показали, что синергистический эффект отмечен при концентрации композиции 0.03% и достаточно низких титрах гриба (2×10^6 конидий/мл) (рис. 2). При данном титре конидий наблюдали вялотекущий микоз, приводящий к 70–80% смертности на 10–13 сут после заражения. При повышении дозы гриба или МУК 35 (или обоих агентов) различия в динамике гибели при моно- и смешанной обработке нивелировались. При снижении титра гриба или концентрации МУК 35 эффект повышения смертности оказывался менее выраженным. Наблюдаемый синергизм может быть отнесен к временному и дополнительному по классификации Бенца [23].

Установлено, что МУК 35 обладает только кишечным действием на насекомых. При перкутанной обработке насекомых 0.03%-ным раствором МУК 35 не отмечено ухудшения питания, задержки развития и смертности личинок, тогда как при скармливании листьев, обработанных МУК 35, все вышеуказанные признаки токсикоза были зарегистрированы.

В экспериментах по исследованию репеллентных и антифидантных свойств МУК 35 установлено, что присутствие данного соединения на листьях не вызывало у личинок реакции избегания растений. Личинки жука в равной степени выбирали листья, обработанные или необработанные

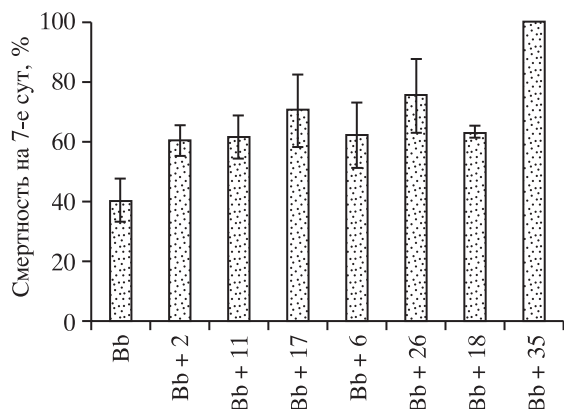


Рис. 1. Совместное действие *Beauveria bassiana* (Bb) (титр – 1×10^7 конидий/мл) и ряда модификантов усниновой кислоты (концентрация 0.05%) на личинок колорадского жука. Вертикальные линии – ошибка среднего арифметического. То же на рис. 2, 3, 4.

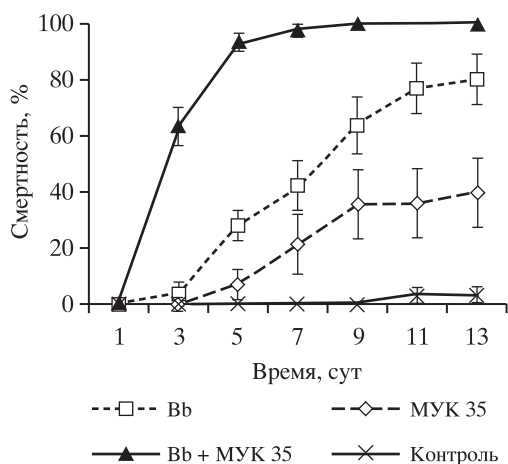


Рис. 2. Смертность личинок колорадского жука под воздействием *B. bassiana* (2×10^6 конидий/мл) и МУК 35 (0.03%) в лабораторном опыте.

этим соединением (рис. 3). Однако доля прогрызов на листьях, обработанных производным усниновой кислоты в концентрации 0.05% оказалась в 4.5 раза меньше, чем на листьях, обработанных водой с ацетоном ($P < 0.0001$).

В полевом эксперименте при моно- и микст-обработках также наблюдали синергизм действия МУК 35 и *B. bassiana* (рис. 4). При этом смертность от обработки МУК 35 не отличалась от контроля, составляя лишь 4%. Биологическая эффективность при внесении смеси агентов составила 98%, при внесении только гриба – 62%. Важно отметить, что в вариантах “МУК 35” и “*B. bassiana* + МУК 35” отмечена слабая поврежденность листьев. Дефолиация картофеля на 10–12 сут опыта составляла в этих случаях всего лишь 15–20, тогда как в варианте “*B. bassiana*” – 60–70, в контроле – 80–90%.

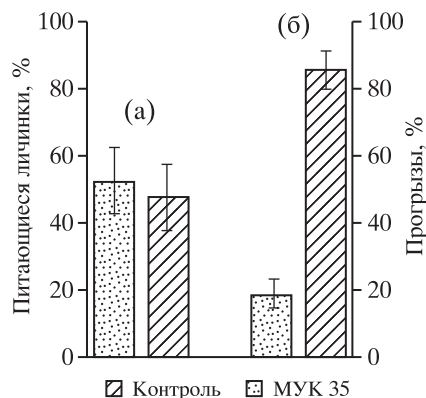


Рис. 3. Репеллентные и антифидантные свойства МУК 35: (а) – доля особей, выбирающих листья картофеля, %; (б) – количество прогрызов на листьях картофеля, % от общей площади листа.

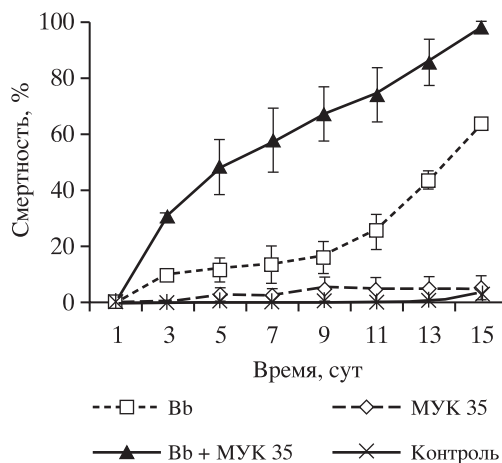


Рис. 4. Смертность личинок колорадского жука под воздействием *B. bassiana* (3×10^7 конидий/мл) и МУК 35 (0.03%) в полевом опыте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, большинство производных усниновой кислоты в концентрации 0.05% не повышало восприимчивость личинок колорадского жука к *B. bassiana*. Наиболее перспективным синергистом *B. bassiana* оказалась смесь полифторсодержащих соединений – МУК 35. Данные соединения обладали антифидантными свойствами и, по всей видимости, вызвали кишечный токсикоз, приводя к гибели части особей и задержке развития выживших личинок. Указанные явления приводили к резкому повышению чувствительности личинок к энтомопатогенному грибу, проникающему в тело хозяина через наружные покровы. Подобные эффекты нередко наблюдают при бинарной обработке насекомых грибами и агентами (биологическими или химическими) с

выраженным кишечным или системным механизмом действия [1, 2, 5–7, 23]. Выявленное сочетание может быть перспективным для создания высокоэффективных комбинированных препаратов против личинок колорадского жука.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сикюра А.И., Сикюра Л.В. Энтомопатогены – грибы, бактерии, простейшие, нематоды // Колорадский картофельный жук *Leptinotarsa decemlineata* Say. Филогения, морфология, физиология, адаптация, естественные враги / Под ред. Ушатинской Р.С. М.: Наука, 1981. С. 299–313.
2. Wraight S.P., Ramos M.E. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* – and *Bacillus thuringiensis tenebrionis* – based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae // J. Invertebr. Pathol. 2005. V. 90. № 3. P. 139–150.
3. Крюков В.Ю., Серебров В.В., Малярчук А.А., Конжасаров Б.К., Мухамедиев Н.С., Орынбаева А.К., Ходырев В.П. Перспективы использования энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Hyphomycetes) против колорадского жука в условиях Юго-Восточного Казахстана // Сиб. вестн. с.-х. науки. 2007. № 4. С. 52–60.
4. Baján C. Changes in the pathogenicity of the entomopathogenic fungi under the influence of the method of culture and infection // Ecol. Polska. 1973. V. 21. № 46. P. 715–729.
5. Kryukov V.Yu., Khodyrev V.P., Yaroslavtseva O.N., Kamenova A.S., Duisembekov B.A., Glupov V.V. Synergistic Action of Entomopathogenic Hyphomycetes and the Bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the Infection of Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. № 5. P. 511–516.
6. Свикле М.Я. Использование биопрепарата боверин совместно с пониженными дозами хлорофоса, полхлоринена в борьбе с колорадским жуком // Бюл. ВИЗР. 1971. № 18. С. 41–42.
7. Furlong M.J., Groden E. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine // J. Econ. Entomol. 2001. V. 94. № 2. P. 344–356.
8. Серебров В.В., Гербер О.Н., Ходырев В.П., Цветкова В.П. Перспективы совместного применения энтомопатогенных грибов и химических инсектицидов // Микол. и фитопатология. 2005. Т. 39. Вып. 3. С. 89–98.
9. 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 *Metharizium anisopliae* infection // Euroasian Entomol. J. 2010. № 4. P. 577–582.
10. Cory J.S., Hoover K. Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions // Trends Ecol. Evolution. 2006. V. 21. № 5. P. 278–286.
11. Emmerich R., Giez I., Lange O.L., Proksch P. Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis* // Phytochem. 1993. V. 33. № 6. P. 1389–1394.
12. 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., Глунов В.В., Салахутдинов Н.Ф., Толстиков Г.А. Усниновая кислота – перспективный синергист для биопрепаратов на основе энтомопатогенных микроорганизмов // ДАН. 2008. Т. 423. № 2. С. 279–282.
13. Sahib K., Kularatne N.S., Kumar S., Karunaratne V. Effect of (+)-usnic acid on the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh.) of tea // J. Natl. Sci. Foundation Sri Lanka. 2008. V. 36. № 4. P. 335–336.
14. Cetin H., Tufan-Cetin O., Turk A.O., Tay T., Candan M., Yanikoglu A., Sumbul H. Insecticidal activity of major lichen compounds, (–)- and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. // Parasitol. Res. 2008. V. 102. № 6. P. 1277–1279.
15. Bomfim R.R., Araujo A.A.S., Cuadros-Orellana S., Melo M.G.D., Quintans L.J., Cavalcanti S.C.H. Larvicidal Activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina* // Latin. Am. J. Pharmacy. 2009. V. 28. № 4. P. 580–584.
16. Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Панченко М.Ю. Способ получения усниновой кислоты: Пат. 2317076, РФ // Б.И. 2008. № 5. С. 85–88.
17. Никольская Е.А. Культивирование грибов // Методы экспериментальной микологии / Под ред. Билай В.И. Киев: Наукова думка, 1982. С. 106–137.
18. Крюков В.Ю., Леднев Г.Р., Левченко М.В., Ярославцева О.Н., Макаров Е.М., Баймагамбетов Е.Ж., Дуйсембеков Б.А., Глунов В.В. Влияние различных наполнителей на биологическую эффективность биомассы конидий энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* против саранчовых в условиях Казахстана // Агрохимия. 2010. № 12. С. 26–30.
19. Бойкова И.В., Новикова И.И. Выделение энтомопатогенных дейтеромицетов // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. Глунова В.В. М.: Круглый год, 2001. С. 698–708.
20. Tazetdinova A.A., Luzina O.A., Polovinka M.P., Salakhutdinov N.F., Tolstikov G.A. Amino-derivatives of usnic acid // Chem. Nat. Compound. 2009. V. 45. № 6. P. 800–804.

21. Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Толстиков Г.А. Химическая модификация усниновой кислоты. Взаимодействие (+)-усниновой кислоты с замещенными фенилгидразинами // Журн. орг. химии. 2009. Т. 45. Вып. 12. С. 1790–1795.
22. Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Толстиков Г.А. Химическая модификация усниновой кислоты. Сообщ. 2. Взаимодействие (+)-усниновой кислоты с аминокислотами // Изв. АН. Сер. хим. 2007. № 6. С. 1203–1205.
23. Бенц Г. Синергизм микроорганизмов и химических инсектицидов // Микроорганизмы в борьбе с вредными насекомыми и клещами / Под ред. Гилярова М.С. М.: Колос, 1976. С. 105–123.

Screening of Usnic Acid Derivatives as Potential Synergists of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for the Control of Colorado Potato Beetle

V.Yu. Kryukov¹, O.A. Luzina², O.N. Yaroslavtseva¹,
M.P. Polovinka², N.F. Salakhutdinov², V.V. Glupov¹

¹*Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences,*

ul. Frunze 11, Novosibirsk, 630091 Russia

²*Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences,*

pr. Akademika Lavrent'eva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

The thirty-five chemical derivatives of R- and S-usnic acid were tested on larvae of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say infected with *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Most derivatives (at a concentration of 0.05%) did not increase the mortality rate of larvae or increased it to a relatively low degree (15–35%). The polyfluorine-containing derivatives synthesized by reaction of S-usnic acid with perfluoropropene caused the highest sustainable increase of mortality rate (50%). Concentrations of the polyfluorine-containing derivatives and titers of the fungus conidia leading to synergistic effect on the mortality of Colorado potato beetle were found under laboratory and field conditions. It was shown that the polyfluorine-containing derivatives reduce the larvae food consumption.

Key words: screening, Leptinotarsa decemlineata, usnic acid, polyfluorine-containing derivatives, Beauveria bassiana, synergistic action, Colorado potato beetle.