

УСНИНОВАЯ КИСЛОТА – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СИНЕРГИСТ ДЛЯ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2008 г. В. Ю. Крюков, В. В. Мартемьянов, М. П. Половинка,
О. А. Лузина, И. М. Дубовский, В. В. Серебров, В. П. Ходырев,
А. А. Малярчук, О. Н. Гербер, О. Н. Ярославцева, Е. А. Боярищева,
М. В. Левченко, В. В. Глупов, Н. Ф. Салахутдинов, академик Г. А. Толстиков

Поступило 28.04.2008 г.

Существенными преимуществами биопрепаратов на основе энтомопатогенных микроорганизмов являются безвредность для позвоночных животных и достаточно узкий спектр действия по отношению к определенным группам насекомых. Однако практическое использование биопрепаратов сопряжено с рядом трудностей, такими как нестабильность действия, длительный латентный период инфекций, низкая биологическая эффективность. В связи с этим представляется актуальным поиск синергистов энтомопатогенных микроорганизмов.

Для повышения биологической эффективности биопрепаратов предложено использовать их совместно с химическими инсектицидами [1–3]. К недостаткам этих смесей относится потеря селективности препаратов и повышение токсичности для позвоночных животных. Кроме того, использование химических агентов в пониженных дозировках может приводить к ускоренному формированию резистентности насекомых к инсектицидам [4].

Известно, что некоторые растения обладают антагонистическими свойствами по отношению к насекомым [5–8]. В частности, нами исследовались инсектицидные свойства экстрактов ряда растений (*Tanacetum vulgare*, *Ledum palustre*, *Cladonia uncialis*, *Sphagnum*, *Conium maculatum*, *Echium vulgare*, *Delphinium dictiocarpum*, *Linaria vulgare*,

Nuphar luteum) и обнаружено, что экстракт *C. uncialis* обладает выраженным антагонистическим действием по отношению к насекомым различных отрядов [9]. В последующем при разделении и очистке экстракта *C. uncialis* было выявлено, что основным антагонистом является усниновая кислота (2,6-диацетил-7,9-гидрокси-8,9b-диметил-1,3 (2H,9bH)-добензо-фурандион).

Ранее исследователями было показано [8, 10], что усниновая кислота обладает антимикробными свойствами. Установлены противовирусные, антибактериальные, антипротозойные, противогрибковые, а также противовоспалительные и болеутоляющие свойства данного соединения. Кроме того, усниновая кислота проявила себя как ингибитор роста, в качестве гербицида и инсектицида [10, 11]. Однако токсичность данного соединения для насекомых установлена лишь [11] на гусеницах совки *Spodoptera littoralis*.

Основная задача данного исследования – установить возможность синергетического действия усниновой кислоты при сочетании с энтомопатогенными вирусами и грибами при инфицировании насекомых из отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera* и *Orthoptera*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Усниновую кислоту выделяли из лишайников родов *Cladonia* и *Usnea* [12]. Для инфицирования насекомых использовали культуры грибов *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, а также вируса ядерного полиэдрома непарного шелкопряда из коллекции микроорганизмов Института систематики и экологии животных СО РАН.

В качестве тест-объектов были взяты личинки II–III возрастов колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say, гусеницы IV–V возрастов большой вощинной огневки *Galleria mellonella* L., гусеницы II–III возрастов непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. и нимфы III–IV возрастов саран-

*Институт систематики и экологии животных
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск*

*Новосибирский государственный аграрный
университет*

*Всероссийский институт защиты растений
РАСХН, Санкт-Петербург*

*Новосибирский институт органической химии
им. В.В. Ворожцова*

Сибирского отделения Российской Академии наук

Таблица 1. Воздействие ВЯП и усниновой кислоты на структурные показатели популяции непарного шелкопряда

№	Вариант	Масса гусениц, мг (21-е сутки)	Масса куколок, мг	Долевая часть самок	Смертность гусениц, % (17-е сутки)
1	ВЯП	480* ^{2, 4}	368* ⁴	0.23* ⁴	13.4* ⁴
2	Усниновая кислота	613* ⁴	470* ⁴	0.22* ⁴	0.0
3	ВЯП + усниновая кислота	444* ^{2, 4}	340* ⁴	0* ^{1, 2, 4}	25.4* ^{1, 2, 4}
4	Контроль	894	640	0.56	1.7

* Различия с уровнем значимости < 0.05 по сравнению с определенным вариантом опыта (отмечено номером).

човых (*Calliptamus barbarus* (Costa), *Locusta migratoria* L.). При обработке насекомых усниновую кислоту сначала растворяли в 0.5 или 1 мл ацетона, затем этот раствор добавляли соответственно в 9.5 или 19 мл суспензии микроорганизмов или воды и резко встряхивали. В контрольные варианты (обработка водой, суспензиями микроорганизмов) добавляли соответствующее количество ацетона. При исследовании влияния на насекомых усниновой кислоты и энтомопатогенных грибов тестируемых личинок и корм погружали в водные суспензии с титром $5 \cdot 10^6$ или $1 \cdot 10^7$ конидий/мл с концентрацией усниновой кислоты 0.1%. При изучении совместного действия усниновой кислоты и вируса ядерного полиэдрома (ВЯП) на непарного шелкопряда обработке подвергали только корм. Титр при этом составлял $1 \cdot 10^7$ полиэдров/мл, концентрация усниновой кислоты 0.1%

Личинок колорадского жука и саранчовых содержали по 5–10 экз. в пластиковых стаканах объемом 700 мл, накрытых сверху сеткой. Гусениц *G. mellonella* содержали в чашках Петри по 10 экз. на одну чашку. Гусениц *L. dispar* содержа-

ли в сосудах емкостью 3 л по 25 особей на сосуд. Смену корма у колорадского жука, непарного шелкопряда и саранчовых проводили на второй день после обработки и далее каждые сутки. Корм большой вощинной огневки сохранялся на протяжении всего эксперимента.

Активность эстераз и концентрацию малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах кишечника личинок *G. mellonella* при питании кормом с добавлением усниновой кислоты определяли спектрофотометрически [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате изучения воздействия вируса ядерного полиэдрома и усниновой кислоты на структурные показатели популяции непарного шелкопряда было получено следующее. При воздействии усниновой кислоты на гусениц шелкопряда установлено достоверное снижение массы личинок и куколок по сравнению с нативными насекомыми (табл. 1). При совместной обработке вирусом и усниновой кислотой также отмечено снижение массы по сравнению с монозаражением вирусом, но отличия в данном случае оказались недостоверными. В результате питания гусениц на листе, обработанной усниновой кислотой, количество самок более чем двукратно снижалось по сравнению с контролем. Кроме того, усниновая кислота вызывала двукратное увеличение смертности гусениц от ВЯП.

Совместное действие усниновой кислоты и гриба *B. bassiana* изучено на представителях отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera* и *Orthoptera*. Уровень смертности большой вощинной огневки и колорадского жука при смешанной обработке был выше, чем при монозаражении грибом на 28–30% (табл. 2). Данные различия фиксировались на 3–8-е сутки эксперимента. В последующем показатели смертности в вариантах *B. bassiana* и *B. bassiana* + кислота нивелировались, достигая 90–100% к 15-м суткам опыта. Гибель под воздействием только усниновой кислоты не отличалась от смертности нативных особей. Однако у гусениц *G. mellonella* под воздействием кислоты отмечено сильное отставание роста и задержка окуклива-

Таблица 2. Смертность насекомых различных отрядов под воздействием *B. bassiana* и усниновой кислоты (титр $5 \cdot 10^6$ конидий/мл для *G. mellonella* и $1 \cdot 10^7$ конидий/мл для остальных насекомых)

Насекомое	Вариант	Смертность на 7-е сутки, %	
		без кислоты	с кислотой
<i>G. mellonella</i>	Вода	10	5
	<i>B. bassiana</i>	26	56*
<i>L. decemlineata</i>	Вода	0	0
	<i>B. bassiana</i>	36	64*
<i>Lo. migratoria</i>	Вода	5	7
	<i>B. bassiana</i>	15	31
<i>C. barbarus</i>	Вода	15	25
	<i>B. bassiana</i>	85	90

* Различия с уровнем значимости < 0.05 по сравнению с вариантом без кислоты.

ния на 10–15 дней. В экспериментах на саранчовых не выявлено достоверного увеличения гибели от микоза под влиянием кислоты, однако тенденция к повышению смертности сохранялась. Данное обстоятельство может быть связано со способностью саранчовых длительное время обходиться без питания, а также с более быстрым продвижением пищи через кишечник и относительно слабой усвояемостью корма.

Следует отметить, что добавление усниновой кислоты в суспензию конидий *M. anisopliae* не вызвало увеличения смертности насекомых, а в ряде опытов, напротив, наблюдалось уменьшение гибели личинок от микоза. В связи с этим мы оценили влияние кислоты на скорость радиального роста микромицетов. Оказалось, что добавление кислоты в агаризованную среду в концентрации от 0.001 до 0.1% не влияет на рост *B. bassiana*, однако угнетает *M. anisopliae*. Скорость роста последнего была в обратной зависимости от концентрации кислоты в среде.

Исследование детоксицирующей системы при скармливании усниновой кислоты личинкам *G. mellonella* показало, что в кишечнике гусениц происходит увеличение активности неспецифических эстераз по сравнению с контролем (рис. 1). Кроме того, в кишечнике личинок установлено достоверное снижение концентрации малонового диальдегида (МДА). Так, уровень МДА на 6-е сутки у нативных насекомых составил 7.05 ± 1.08 нмоль/мг белка, а у питающихся кормом с добавлением усниновой кислоты – 3.84 ± 0.57 нмоль/мг белка. Последнее может указывать на снижение активности процессов перекисного окисления липидов в кишечнике насекомых. Повышенная активность эстераз в кишечнике может быть направлена на детоксикацию метаболитов, образующихся под действием усниновой кислоты, при этом снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов может свидетельствовать о повышении активности антиоксидантной и детоксицирующей систем. Данные изменения характерны для токсикозов, вызываемых скармливанием вторичных метаболитов растений в небольших концентрациях [14]. Таким образом, увеличение активности неспецифических эстераз и снижение концентрации МДА могут быть свидетельством токсичного действия усниновой кислоты на организм насекомого.

Анализируя полученные результаты, можно предположить, что усниновая кислота обладает непосредственным токсическим эффектом на насекомых, а возможно, и репеллентными свойствами, тем самым снижая потребление корма. Поскольку известно антагонистическое действие усниновой кислоты на многие микроорганизмы (бактерии, грибы, простейшие) [8, 10], не исключено, что кислота оказывает негативное действие

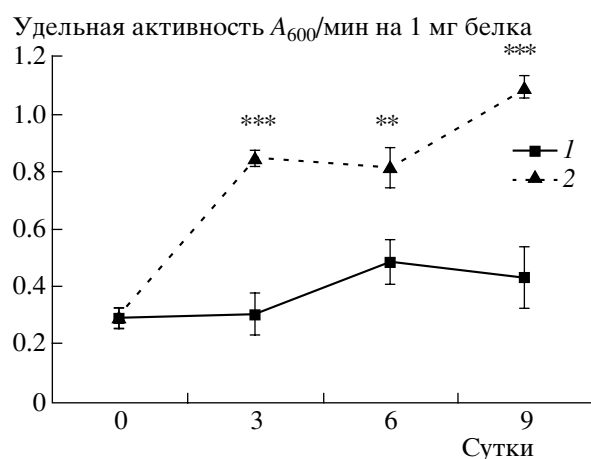


Рис. 1. Активность неспецифических эстераз в кишечнике личинок *G. mellonella* V–VI возрастов при скармливании усниновой кислоты (0.1%). 1 – нативные личинки, 2 – личинки, питающиеся кормом с добавлением усниновой кислоты (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем).

на симбионтную флору насекомого, в результате чего жизнеспособность организма снижается. Кроме того, наблюдающаяся под действием кислоты задержка роста и линьки может благоприятствовать проникновению гифальных тел гриба через кутикулу в гемоцель и как следствие – приводить к ускоренному течению микозов.

Таким образом, использование растительных метаболитов, которые не обладают ярко выраженным инсектицидным эффектом и не оказывают существенного влияния на окружающую среду, но в то же время активизируют патогенов насекомых, весьма перспективно для создания биопрепаратов. Сочетание усниновой кислоты с энтомопатогенными вирусами и грибами (*B. bassiana*) приводит к синергетическому или аддитивному эффектам в смертности насекомых из различных отрядов. Выявленные сочетания могут быть использованы для создания комбинированных препаратов с высокой летальной эффективностью для колорадского жука и чешуекрылых насекомых. Перспективным направлением этих исследований является изучение механизмов, ответственных за увеличение восприимчивости насекомых к микроорганизмам при потреблении усниновой кислоты, а также испытание модификантов данного соединения [15] для поиска более выраженного синергизма.

Работа поддержана грантами РФФИ (проекты 06–04–48647; 06–04–49164, офис 06–04–08174), Интеграция СО РАН (грант № 100).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бенц Г. В кн.: Микроорганизмы в борьбе с вредными насекомыми и клещами. М.: Колос, 1976. С. 105–123.

2. *Серебров В.В., Ходырев В.П., Гербер О.Н., Цветкова В.П.* // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39. № 3. С. 89–98.
3. *Furlong M.J., Groden E.* // J. Econ. Entomol. 2001. V. 94. № 2. P. 344–356.
4. *Харсун А.И.* Биохимия насекомых. Кишнев: Картя Молдавенска, 1976. 270 с.
5. *Крылов Г.В.* Травы жизни и их искатели. Новосибирск: Зап.-Сиб. кн. изд-во, 1972. 163 с.
6. *Минаева В.Г.* Лекарственные растения Сибири. Новосибирск: Наука, 1991. 412 с.
7. *Kuusik A., Harak M., Hiisaar K. et al.* // Thermochim. acta. 1995. V. 251. № 1. P. 247–253.
8. *Cocchietto M., Skert N., Nimis P.L., Sava G.* // Naturwissenschaften. 2002. Bd. 89. № 4. S. 137–146.
9. *Дубовский И.М.* Антиоксидантная система кишечника личинок *Galleria mellonella* L. при бактериозе и воздействии вторичных метаболитов растений. Дис. канд. биол. наук. Новосибирск: ИС и ЭЖ СО РАН, 2005. 139 с.
10. *Ingoldsdottir K.* // Phytochemistry. 2002. V. 61. № 7. P. 729–736.
11. *Emmerich R., Giez I., Lange O.L., Proksch P.* // Phytochemistry. 1993. V. 33. № 6. P. 1389–1394.
12. *Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Панченко М.Ю.* Способ получения усниновой кислоты. Пат. РФ № 2317076С1 // Бюл. Изобр. 2008. № 5. 4 с.
13. *Дубовский И.М., Олифиренко О.А., Глунов В.В.* // Журнал эволюц. биохимии и физиологии. 2005. Т. 41. С. 18–22.
14. *Johnson K.S., Felton G.W.* // J. Chem. Ecol. 2001. V. 27. № 12. P. 2579–2597.
15. *Фурин Г.Г., Лузина О.А., Сокуев Р.И. и др.* // Изв. РАН. Сер. хим. 2007. № 6. С. 1198–1202.