

4-бөлім

Раздел 4

Section 4

Микробиология

Микробиология

Microbiology

УДК 632.9.68.37.13

Н.Д. Слямова*, ²И.М. Дубовский, ¹А.Б. Белгибаева, ¹Б.А. Дуйсембеков¹Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений, Казахстан, г. ???²Институт систематики и экологии животных СО РАН, Россия, г. Новосибирск

*E-mail: n.slyamova@mail.ru

Активность детоксицирующих ферментов у личинок азиатской саранчи при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae*

Проведен анализ активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансферазы в гомогенатах целого тела, лимфе и жировом теле у личинок азиатской саранчи *Locusta migratoria* L. при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Установлено, что воздействие летальной дозы гриба (ЛК80) сопровождается стимуляцией детоксицирующих ферментов в гомогенате целого тела личинок *L. migratoria* на третьи сутки после заражения. Показано, что происходит увеличение активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансферазы в лимфе и в жировом теле зараженных насекомых на 3 сутки развития инфекции. К шестым суткам микоза в «острый» период инфекционного процесса у насекомых наблюдается снижение активности ферментов до контрольных значений. Активация компонентов детоксицирующей системы на начальном этапе развития острой грибной инфекции может свидетельствовать об участии детоксицирующих ферментов в защитных реакциях насекомых, направленных против грибной инфекции.

Ключевые слова: *Locusta migratoria* L., *Metarhizium anisopliae*, неспецифическая эстераза, глутатион-S-трансфераза, активность.

N.D. Slyamova, I.M. Dubovskiy, A.B. Belgibaeva, B.A. Duisembekov

The activity of detoxifying enzymes in larvae of the locusts *locusta migratoria* l. the development of fungal infections of *metarhizium anisopliae*

The analysis of the activity of nonspecific esterases and glutathione-S-transferase in homogenates of the whole body, lymph and fat body in larvae of the locusts *Locusta migratoria* L. the development of fungal infections of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. It is established that exposure to a lethal dose of the fungus (LC80), followed by stimulation of detoxifying enzymes in the homogenate of the whole body of larvae of *L. migratoria* on the third day after infection. It is shown that there is an increase of activity of nonspecific esterases and glutathione-S-transferase in the lymph and fat body of infected insects on day 3 of infection. By the sixth day of mycosis in the “hot” during the infection process in insects a decrease in enzyme activity to control values. Activation of components of the detoxification system in the initial phase of acute fungal infections may indicate involvement of detoxifying enzymes in the defense reactions of insects against fungal infection.

Keywords: *Locusta migratoria* L., *Metarhizium anisopliae*, nonspecific esterase, glutathione-S-transferase, activity.

Н.Д. Слямова, И.М. Дубовский, А.Б. Белгибаева, Б.А. Дуйсембеков

***Metarhizium anisopliae* саңырауқұлағы инфекциясының дамуы барысында азиялық шегіртке дернәсілдерінің детоксикация ферменттерінің белсенділігі**

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin саңырауқұлағы инфекциясының дамуы барысында *Locusta migratoria* L. азиялық шегірткесінің дернәсілдерінің бүтін денесінің гомогенатында, лимфасында

және майлы денелеріндегі өзіндік емес эстераза мен глутатион-S-трансферазаның белсенділігіне талдау жасалды. Саңырауқұлақтың леталды мөлшері (JK80) *L. migratoria* дернәсілдерінің бүтін денелерінің гомогенатында залалдаудан кейінгі 3 тәулікте детоксикация ферменттерінің белсенділігі жоғарылады. Залалдаудан кейінгі 3 тәулікте лимфа мен майлы денелерде де өзіндік емес эстераза мен глутатион-S-трансферазаның белсенділігінің артатыны байқалды. Микоз дамуының 6 тәулігінде, яғни инфекцияның қарқынды дамуы кезінде бунақденелілерде ферменттер белсенділігінің бақылау көрсеткішіне дейін төмендейтіні байқалды. Саңырауқұлақ инфекциясының бастапқы дамуындағы детоксикация жүйесі компоненттерінің белсенділігі олардың бунақденелілердің саңырауқұлақ инфекцияларына қарсы бағытталған қорғаныс реакцияларына қатысатындығын дәлелдеуі мүмкін.

Түйін сөздер: *Locusta migratoria* L., *Metarhizium anisopliae*, өзіндік емес эстераза, глутатион-S-трансфераза, белсенділік.

Введение

Использование биологических методов контроля численности фитофагов привлекает все больший интерес исследователей к механизмам, обеспечивающим резистентность насекомых к паразитам. Процесс инфицирования насекомых энтомопатогенными грибами начинается с адгезии и прорастания конидий на поверхности кутикулы насекомых. При этом толщина, структура, химический состав кутикулы имеют важнейшее значение для развития микозов и формирования резистентности насекомых [1, 2]. Механизмы резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам, помимо кутикулярного барьера, включают системы, направленные на элиминацию патогенов, а также деградацию токсичных продуктов их метаболизма [1, 3]. В частности, при изучении резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам было показано, что существенную роль при развитии микозов играют механизмы, направленные на детоксикацию продуктов метаболизма патогенов [3, 4, 5]. Это связано с тем, что энтомопатогенные грибы обладают большим арсеналом метаболитов, участвующих в инфекционном процессе, и отличительной чертой микозов является интоксикация организма насекомых [6, 7, 8, 9].

Основными ферментативными системами насекомых, участвующими в процессе детоксикации различных ксенобиотиков, являются монооксигеназы, эстеразы и глутатион-S-трансфераза (ГСТ) [10]. Неспецифические эстеразы выполняют ряд важных функций в организме насекомых: они осуществляют энергетически важный катализм эфиров высших жирных кислот, активно происходящий в летательных мышцах и обеспечивающий полет насекомого, мобилизацию липидов, в том числе жиров в жировом теле [11];

деградацию метаболитических инертных эфиров, в том числе и разнообразных ксенобиотиков [12]. Широкая субстратная специфичность эстераз свидетельствует об их исключительной роли в деградации токсинов различного происхождения. Интерес исследователей к ГСТ насекомых связан, прежде всего, с участием этих ферментов в деградации инсектицидов. При этом обнаружено, что у насекомых, устойчивых к инсектицидам, повышается активность ГСТ [13]. Помимо деградации ксенобиотиков, ГСТ участвуют в выведении продуктов метаболизма из организма и защите тканей от повреждения свободными радикалами [14, 15].

Установлено, что неспецифические эстеразы и глутатион-S-трансферазы насекомых участвуют в процессах метаболизма и детоксикации фосфорорганических соединений, пиретроидов, карбаматов, ювеноидов [16, 17]. В частности, повышенная экспрессия генов детоксицирующих ферментов, ответственных за механизмы резистентности к различным ксенобиотикам, была показана на насекомых отрядов Hemiptera (*Lygus lineolaris* L., *M. persicae* L.), Hymenoptera (*Habrobracon hebetor* Say.), Lepidoptera (*Chilo suppressalis* Walker), и Diptera [*Haematobia irritans* (L.), и *C. pipiens*] [18; 19; 20; 21].

Предполагается, что именно функция деградации токсичных молекул эстеразами и ГСТ при развитии инфекционного процесса играет одну из ключевых ролей в защите насекомых от патогенов. Показано, что при микроспориозных, бактериальных и грибных инфекций у личинок большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* L. и тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. происходит индукция новых изоформ неспецифических эстераз и изменение активности эстераз в различных органах [3; 22, 23].

Более того, использование синтетических ингибиторов детоксицирующей системы насекомых позволило снизить устойчивость *G. mellonella* к энтомопатогенным грибам [4, 5]. Исследования детоксицирующих ферментов саранчовых при микозе практически не проводилось [24]. В связи с этим, целью исследования было изучить активность неспецифических эстераз и ГСТ в гомогенатах целого тела и различных органов у личинок азиатской саранчи *Locusta migratoria* при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae*.

Материалы и методы

Личинки азиатской саранчи *Locusta migratoria* были собраны в естественных условиях и содержались в лабораторных условиях при 12 часовом световом дне. Насекомые питались на тростнике обыкновенном *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. При проведении эксперимента использовали личинок младших 2-3 и старших 4-5 возрастов.

Для заражения насекомых использовали энтомопатогенный гриб *Metarhizium anisopliae* штамм Р-72. Насекомых заражали с помощью однократного погружения в водную суспензию конидий грибов (титр конидий 1×10^7).

Гомогенаты целого тела и жирового тела насекомых готовили в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7,2) (ФБ). На одну повторность использовали 5 личинок. Насекомых и извлеченные органы растирали в стеклянном гомогенизаторе с холодным ФБ в соотношении 0,06 г тканей на 1 мл буфера. Затем гомогенаты центрифугировали при 4°C в течение 15 мин при 10 000 g. Полученный супернатант использовали для определения ферментативной активности и концентрации белка.

Гемолимфу отбирали стеклянным капилляром через надрез в кутикуле и помещали в охлажденные пробирки. Для предотвращения меланизации гемолимфы в пробирки добавляли фенилтиомочевину (до насыщения – 4 мкг/мл). Гемолимфу центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 g, после чего полученный супернатант, свободный от клеток, использовали для определения активности ферментов и концентрации белка.

Спектрофотометрическое определение активности эстераз в различных органах (гемолимфе,

жировом теле, кишечнике) и гомогенатах тканей было проведено по К. Асперену [25] с незначительными изменениями. Инкубационная смесь содержала 1мл 0,54 мМ 1-нафтилацетата в ФБ и 20 мкл опытного образца. Концентрацию образующегося во время реакции 1-нафтила определяли спектрофотометрически при длине волны 550 нм.

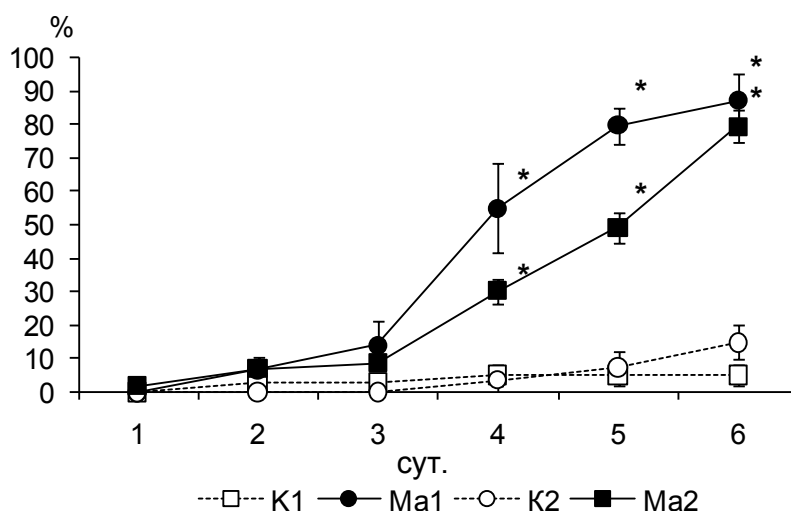
Активность ГСТ определяли по отношению к 2-нитро 5-тиобензойной кислоте (ДНХБ) методом В. Хабига [26]. Инкубация была проведена при 25°C в течение 5 мин в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 6,5), содержащем 1 мМ глутатиона, 1мМ ДНХБ и 20 мкл опытного образца. Реакцию инициировали добавлением раствора ДНХБ в ацетоне. Концентрацию 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, образующегося во время реакции, определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Удельную активность неспецифических эстераз и ГСТ выражали в единицах изменения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 минуту и 1 мг белка.

Концентрацию белка в гемолимфе и гомогенатах тканей определяли по методу М. Бредфорда (1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Полученные данные представлены как среднее арифметическое и его ошибки. Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента с помощью программы STATISTICA 6.0.

Результаты и их обсуждение

В результате заражения личинок азиатской саранчи грибом *M. anisopliae* зафиксировано развитие инфекционного процесса с суммарной смертностью к 6-7 суткам $81,5 \pm 2,7\%$ у личинок младших возрастов и $87,1 \pm 8,3\%$ у личинок старших возрастов. Следует отметить, что к 3 суткам развития заболевания смертность зараженных насекомых обеих групп составляла 10-15% и достоверно не отличалась от контроля (рисунок 1). Данный факт позволяет выделить 3 суток как «начальный» период развития инфекции. Общая динамика смертности насекомых свидетельствует о развитии «острого» грибного патогенеза.



K1 – смертность нативных личинок младших возрастов; Ma1 – смертность личинок младших возрастов, зараженных грибом; K2 – смертность нативных личинок старших возрастов; Ma2 – смертность личинок старших возрастов, зараженных грибом (* $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

Рисунок 1 – Динамика гибели личинок азиатской саранчи младших и старших возрастов при инфицировании энтомопатогенным грибом *Metarhizium anisopliae*

В результате исследований установлено, что воздействие гриба сопровождается стимуляцией детоксицирующих ферментов на 3 сутки развития болезни. В частности, при анализе активности неспецифических эстераз и ГСТ в гомогенатах целого тела личинок ази-

атской саранчи младших возрастов было зафиксировано достоверное ($p \leq 0,001$) 2-кратное увеличение активности эстераз на 3 сутки после заражения. Также было отмечено 2,5 кратное ($p \leq 0,001$) увеличение активности ГСТ (рисунок 2).

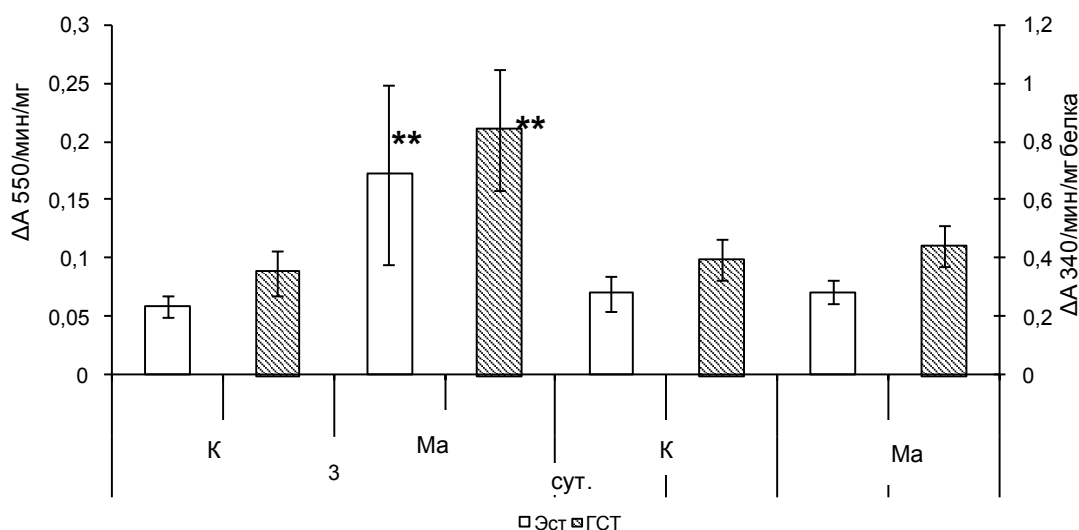
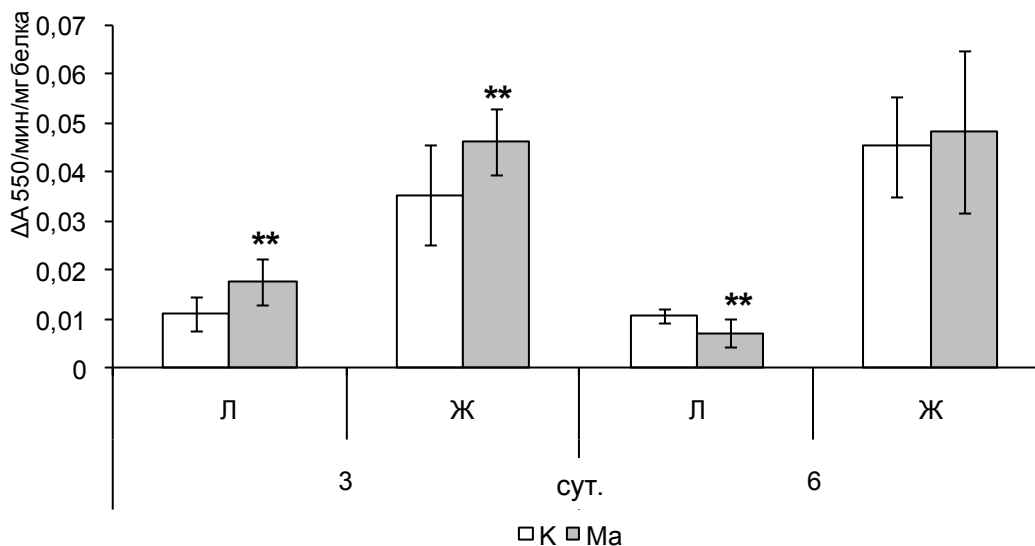


Рисунок 2 – Активность неспецифических эстераз (Эст) и глутатион-S-трансферазы (ГСТ) в гомогенатах целого тела личинок азиатской саранчи младших возрастов при заражении энтомопатогенным грибом *Metarhizium anisopliae* (n=10; ** $p < 0,001$ по сравнению с контролем)

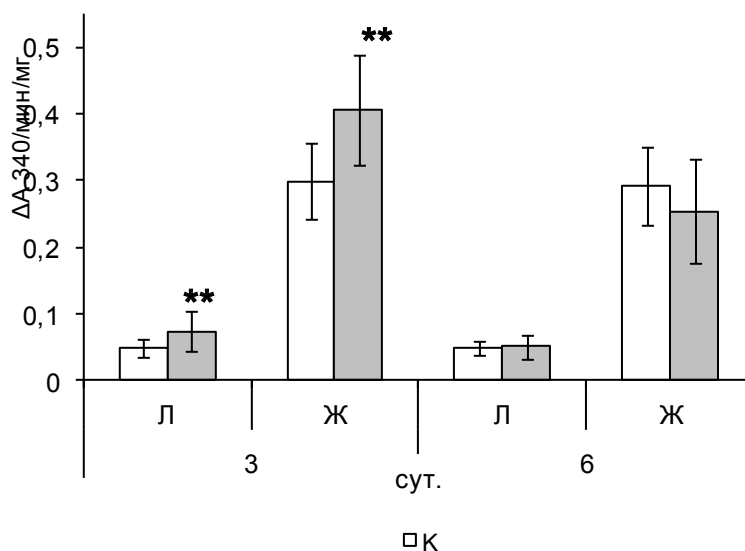
Кроме того, у личинок старших возрастов при заражении *M. anisopliae* зафиксировано достоверное увеличение активности неспецифических

эстераз и ГСТ в лимфе в 1,7 раза и в 2 раза ($p \leq 0,001$) соответственно, а также в жировом теле – эстераз в 1,3 раза и ГСТ в 1,4 раза ($p \leq 0,001$) (рисунки 3; 4).



К – контроль, Ма – гриб *M. anisopliae* (n=20; ** p<0,001; по сравнению с контролем)

Рисунок 3 – Активность неспецифических эстераз в лимфе (Л) и жировом теле (Ж) азиатской саранчи старших возрастов на различных этапах развития грибной инфекции



К – контроль, Ма – гриб *M. anisopliae* (n=20; ** p<0,001; по сравнению с контролем)

Рисунок 4 – Активность глутатион-S-трансферазы в лимфе (Л) и жировом теле (Ж) азиатской саранчи старших возрастов на различных этапах развития грибной инфекции

Активация компонентов детоксицирующей системы на начальном этапе развития «острой» грибной инфекции ($ЛД_{80}$) может свидетельствовать об участии неспецифических эстераз и ГСТ в защитных реакциях насекомых, направленных на разрушение токсинов энтомопатогенных грибов, соответственно против грибной инфекции. Ранее сходные результаты были получены при изучении роли неспецифических эстераз при развитии микозов на личинках пчелиной огневки *Galleria mellonella* (L.). В частности, было установлено, что инфицирование насекомых энтомопатогенными грибами сопровождается резким увеличением активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз в гемолимфе. Кроме того, было показано, что повышение активности неспецифических эстераз происходит за счет индукции дополнительных изоферментов [3]. Также при исследовании активности кислых фосфатаз при развитии микоза на перелетной саранче *Schistocerca gregaria* отмечено увеличение активности фермента в лимфе [24].

Предполагается, что основным фактором, приводящим к повышению активности детоксицирующих ферментов при микозах, является механическое повреждение тканей кутикулы насекомых гифальными телами грибов при их проникновении в организм хозяина, а также воздействие токсинов гриба, проникающих в гемоцель насекомого [3, 5, 24].

Таким образом, отмеченное нами увеличение активности неспецифических эстераз и ГСТ, позволяет предположить, что активность детоксицирующих ферментов личинок азиатской саранчи может быть направлена на элиминацию грибных метаболитов и токсичных веществ, образующихся при проникновении энтомопатогенного гриба в гемоцель насекомого.

Отмеченное нами снижение активности эстераз и ГСТ в «острый» период микоза может быть связано с «мощным» подавлением защитных систем хозяина энтомопатогенными грибами. Данное предположение подтверждают исследования защитных реакций перелетной саранчи *S. gregaria* при развитии микоза *M. anisopliae*. В частности, было установлено резкое снижение активности фенолоксидаз, антибактериальной активности и общего числа гемоцитов у зараженных насекомых [27].

Исходя из полученных данных, можно предположить, что детоксицирующая система саранчовых участвует в защитных реакциях против энтомопатогенных грибов. Следует отметить, что одним из современных биотехнологических методов является поиск путей блокирования или снижения активности защитных систем насекомых для увеличения их восприимчивости к энтомопатогенам, применяемым в биологических методах контроля численности насекомых. Полученные нами результаты свидетельствуют, что на начальных этапах развития микозов активность неспецифических эстераз и ГСТ личинок *L. migratoria* может быть направлена на детоксикацию метаболитов и токсинов энтомопатогенных грибов. Не исключено, что использование механизмов, воздействующих на детоксицирующую систему насекомого: вторичные метаболиты растений, синтетические ингибиторы и т.д. позволит снизить устойчивость саранчовых к энтомопатогенам, в частности к грибам.

Исследования проведены при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грант 00-04-48647, «Интеграция» СО РАН, грант №100 и Комитета науки МСХ Республики Казахстан.

Литература

- 1 Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / под ред. В.В. Глупов. – М.: Круглый год, 2001. – 736 с.
- 2 Leger R.J.St., Cooper R.M., Charnley A.K. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae* // J. Invertebr. Pathol. – 1988. – V. 52. – P. 459-470.
- 3 Серебров В.В., Алексеев А.А., Глупов В.В. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц воиной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae) при микозах // Известия РАН. Сер. биол. – 2001. – № 5. – С. 588-592.
- 4 Серебров В.В., Киселев А.А., Глупов В.В. Изучение некоторых факторов синергизма между энтомопатогенными грибами и химическими инсектицидами // Микология и фитопатология. – 2003. – Т.1. – Вып. 37. – С. 76-82.
- 5 Серебров В.В., Гербер О.Н., Малярчук А.А., Мартемьянов В.В., Алексеев А.А., Глупов В.В. Влияние энтомопатогенных грибов на активность детоксицирующих ферментов гусениц пчелиной огневки *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) и роль детоксицирующих ферментов при формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам. // Известия РАН. Сер. биол. – 2006. – №6. – С. 581-586.

- 6 Vilcinskis A., Jegorov A., Landa Z. et al. Effect of beauverolide L and cyclosporin A on humoral and cellular immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella* // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1999. – V.122. – P. 83-92.
- 7 Hajek A.E., Leger R.J. St. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts // *Annu. Rev. Entomol.* – 1994. – V.39. – P. 293-322.
- 8 James P.J., Charnley A.K., Reynold S.E. The effect destruxins on the structure and function of insect malpighia tubus // *IOBC WPRS Bulletin.* – 1994. – V. 17. – P. 218-221.
- 9 Charnley A.K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins // *Advances in Botanical Research.* – 2003. – P. 241-321.
- 10 Li X., Schuler M.A., Berenbaum M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. // *Annu. Rev. Entomol.* – 2007. – V. 52 – P. 231–253.
- 11 Рославцева С.А., Баканова Е.И., Еремина О.Ю. Эстеразы членистоногих и их роль в механизмах детоксикации инсектоакарицидов // *Известия РАН. Сер. биол.* – 1993. – № 3. – С. 368-375.
- 12 Terriere L.C. Induction of detoxication enzymes in insects // *Ann. Rev. Entomol.* – 1984. – V. 29. – P. 71-88.
- 13 Papadopoulos A.I., Boukouvala E., Kakaliouras G., Kostaropoulos J., Papadopoulos-Mourkidou E. Effect of organophosphate and pyrethroid insecticides on the expression of GSTs from *Tenebrio molitor* pupae // *Pesticide Biochem. Physiol.* – 2000. – V. 68. – P. 26-33.
- 14 Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы // *Усп. совр. биол.* – 1989. – Т.107. – Вып.2. – С. 179-194.
- 15 Баканова Е.И., Еремина О.Ю., Рославцева С.А. Свойства и функции глутатион-3-трансферазы членистоногих // *Известия РАН. Сер. биол.* – 1992. – № 4. – С. 537-545.
- 16 Small G.J., Hemingway J. Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* // *Insect Mol. Biol.* – 2000. – V. 9. – P. 647-653.
- 17 Pasteur N., Nance E., Bons N. Tissue localization of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) // *J. Med. Entomol.* – 2001. – V.38. – P. 791-801.
- 18 Field LM, Devonshire AL. Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family // *Biochem. J.* – 1998. – V.330. – P. 169–173.
- 19 Hemingway J, Hawkes N, Prapanthadara L, Jayawardenal KGI, Ranson H. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. // *Philos. Trans. R. Soc. London B.* – 1998. – V. 353. – № 1376. – P.1695–1699.
- 20 Field LM. Methylation and expression of amplified esterase genes in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) // *Biochem. J.* – 2000. – V. 349. – P.863–868.
- 21 Hawkes N.J., Hemingway J. Analysis of the promoters for the -esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – V. 1574. – P.51-62.
- 22 Воронцова Я.Л., Ершов Н.И., Глупов В.В. Влияние микроспоридии *Vairimorpha ephestiae* (Microsporidia: Burenellidae) на активность и спектр неспецифических эстераз различных тканей личинок большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) // *Паразитология.* – 2006. – Т. 40. – № 1. – С. 74-84.
- 23 Shiotsuki T., Kato Y. Induction of carboxylesterase isozymes in *Bombyx mori* by *E. coli* infection // *Biochemistry and Molecular Biology.* – 1999. – V. 29. – P. 731-736.
- 24 Xia Y., Dean P., Judge A.J., Gillespie J.P., Clarkson J.M., Charnley A.K. Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* // *J. Insect Physiol.* – 2000. – V. 46. – P. 1249-1257.
- 25 Asperen K. Van. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method // *J. Insect Physiol.* – 1962. – V. 8. – P. 401-416.
- 26 Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. // *J. Biol. Chem.* – 1974. – V.249. – P. 7130-7139.
- 27 Gillespie J.P., Burnett C., Charnley A.K. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var *acidum* // *J. Insect Physiol.* – 2000. – V.46. – P. 429-437.