

УДК 592+591.2+91.113

АКТИВНОСТЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭСТЕРАЗ И ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ У ЛИЧИНОК ПЕРЕЛЕТНОЙ САРАНЧИ (*LOCUSTA MIGRATORIA*) ПРИ РАЗВИТИИ ГРИБНОЙ ИНФЕКЦИИ *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (ASCOMYCOTA, HYPOCREALES)

© 2011 г. И. М. Дубовский¹, Н. Д. Слямова², В. Ю. Крюков¹, О. Н. Ярославцева¹, М. В. Левченко³, А. Б. Белгибаева², А. Адилханкызы², В. В. Глупов¹

¹ Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск 630091, Россия

² Научно-исследовательский институт защиты и карантина растений, Алматинская обл. 040924, Республика Казахстан

³ Всероссийский институт защиты растений РАСХН, С.-Петербург, Пушкин 196608, Россия
e-mail: dubovskiy2000@yahoo.com

Поступила в редакцию 26.01.2011 г.

Проанализирована активность неспецифических эстераз и глутатион-S-трансферазы в гомогенатах целого тела, плазме гемолимфы и жировом теле личинок перелетной саранчи (*Locusta migratoria*) при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae*. Воздействие летальной дозы гриба (ЛК₈₀) сопровождается увеличением активности детоксицирующих ферментов в гомогенате целого тела, полученного из личинок *L. migratoria* на третьи сутки после заражения. Показано увеличение активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансферазы в плазме гемолимфы и жировом теле зараженных насекомых на третьи сутки развития инфекции. К шестым суткам микоза в “острый” период инфекционного процесса активность ферментов снижается до контрольных значений. Вероятно, детоксицирующие ферменты участвуют в защитных реакциях насекомых на начальном этапе развития острой грибной инфекции.

Ключевые слова: детоксицирующая система, эстеразы, жировое тело, азиатская саранча, микозы, энтомопатогенные грибы.

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 (Leger et al., 1988; Глупов, 2001). Механизмы резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам, помимо кутикулярного барьера, включают системы, направленные на элиминацию патогенов и деградацию токсичных продуктов их метаболизма (Глупов, 2001; Серебров и др., 2001). При изучении резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам была показана существенная роль механизмов, направленных на детоксикацию продуктов метаболизма патогенов при развитии микозов (Серебров и др., 2001, 2003, 2006). Активация детоксицирующих систем насекомых при микозах, вероятно, связана с тем, что энтомопатогенные грибы обладают большим арсеналом метаболитов, участвующих в инфекционном процессе, и отличительной чертой микозов является интоксикация организма

насекомых (Hajek, Leger, 1994; James et al., 1994; Vilcinskis et al., 1999; Charnley, 2003).

Основными ферментативными системами насекомых, участвующими в процессе детоксикации различных ксенобиотиков, являются монооксигеназы, эстеразы и глутатион-S-трансфераза (ГСТ) (Li et al., 2007). Неспецифические эстеразы выполняют важные функции в организме насекомых: осуществляют катаболизм эфиров высших жирных кислот, активно происходящий в летательных мышцах и обеспечивающий полет насекомого, мобилизацию липидов, в том числе жиров в жировом теле (Ярославцева и др., 1993), и деградацию метаболитических инертных эфиров, в том числе и разнообразных ксенобиотиков (Tegge, 1984). 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. Обнаружено, что у насекомых, устойчивых к инсектицидам, повышается активность ГСТ (Papadopoulos et al., 2000). Помимо деградации ксенобиотиков, ГСТ

участвует в выведении продуктов метаболизма из организма и защите тканей от повреждения свободными радикалами (Колесниченко, Кулинский, 1989; Баканова и др., 1992).

Установлено, что неспецифические эстеразы и ГСТ насекомых участвуют в процессах метаболизма и детоксикации фосфорорганических соединений, пиретроидов, карбаматов, ювеноидов (Small, Hemingway, 2000; Pasteur et al., 2001). Показана повышенная экспрессия генов детоксицирующих ферментов, ответственных за механизмы резистентности к различным ксенобиотикам, на насекомых из отрядов: полужесткокрылых (Hemiptera) – клопе *Lygus lineolaris* Pal. de Beauv. и персиковой тле (*Myzodes persicae* Sulz.), перепончатокрылых (Hymenoptera) – наезднике габробраконе (*Habrobracon hebetor* Say.), чешуекрылых (Lepidoptera) – стеблевой огневке (*Chilo suppressalis* Walker), двукрылых (Diptera) – малой коровьей жигалке (*Haematobia irritans* L.) и комаре обыкновенном (*Culex pipiens* L.) (Field, Devonshire, 1998; Hemingway et al., 1998; Field, 2000; Hawkes, Hemingway, 2002).

Возможно, функция деградации токсичных молекул эстеразами и ГСТ при развитии инфекционного процесса играет одну из ключевых ролей в защите насекомых от патогенов. Установлено, что при микроспоридиозных, бактериальных и грибных инфекциях у личинок воиной огневки (*Galleria mellonella* L.) и тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.) происходит индукция новых изоформ неспецифических эстераз и изменение активности эстераз в различных органах (Shiotsuki, Kato, 1999; Серебров и др., 2001; Воронцова и др., 2006). Использование синтетических ингибиторов детоксицирующей системы насекомых позволило снизить устойчивость *G. mellonella* к энтомопатогенным грибам (Серебров и др., 2003, 2006). Исследования детоксицирующих ферментов саранчовых при микозе практически не проводили (Xia et al., 2000). Цель настоящего исследования – изучение активности неспецифических эстераз и ГСТ в гомогенатах целого тела, плазме гемолимфы и жировом теле личинок перелетной саранчи (*Locusta migratoria*) при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Личинки перелетной саранчи (*Locusta migratoria*) собраны в естественных условиях на рисовых чеках в окрестностях п. Баканас (Казахстан) и содержались в лаборатории при 12-часовом световом дне. Насекомые питались на тростнике обыкновенном (*Phragmites communis* Trin.). При проведении эксперимента использовали личинок младших 2–3-го и старших 4–5-го возрастов.

После заражения грибом у насекомых проводилась оценка активности неспецифических эс-

тераз и ГСТ в гомогенате целого тела личинок младших возрастов, а также в плазме гемолимфы и жировом теле личинок старших возрастов.

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

Гомогенаты из целого тела и жирового тела насекомых готовили в 0.1 М Na-фосфатном буфере (pH 7.2) (ФБ). В одной повторности использовали 5 личинок. Насекомых и извлеченные органы растирали в стеклянном гомогенизаторе с холодным ФБ в соотношении 0.06 г тканей на 1 мл ФБ. Затем гомогенаты центрифугировали при 4°C в течение 15 мин при 10000 RCF. Полученный супернатант использовали для определения активности ферментов и концентрации белка.

Гемолимфу отбирали стеклянным капилляром через надрез в кутикуле и помещали в охлажденные пробирки. Для предотвращения меланизации гемолимфы в пробирки добавляли фенолтиомочевину (4 мг/мл). Гемолимфу центрифугировали при 4°C в течение 5 мин при 500 RCF, плазму, свободную от клеток, использовали для определения активности ферментов и концентрации белка.

Спектрофотометрическое определение активности эстераз в образцах проведено по Асперену (Asperen, 1962) с незначительными изменениями. Инкубационная смесь содержала 1 мл 0.54 мМ 1-нафтилацетата в ФБ и 20 мкл образца. Концентрацию образующегося во время реакции 1-нафтила определяли спектрофотометрически при длине волны 550 нм.

Активность ГСТ определяли по отношению к 2-нитро-5-хлорбензойной кислоте (ДНХБ) методом Хабига (Habig et al., 1974). Инкубацию проводили при 25°C в течение 5 мин в 0.1 М Na-фосфатном буфере (pH 6.5), содержащем 1 мМ глутатиона, 1 мМ ДНХБ и 20 мкл 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 мин и 1 мг белка.

Концентрацию белка в образцах определяли по методу Бредфорда (1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сыроточный альбумин.

Полученные данные представлены как среднее арифметическое и его ошибка (*SE*). Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий определяли по *t*-

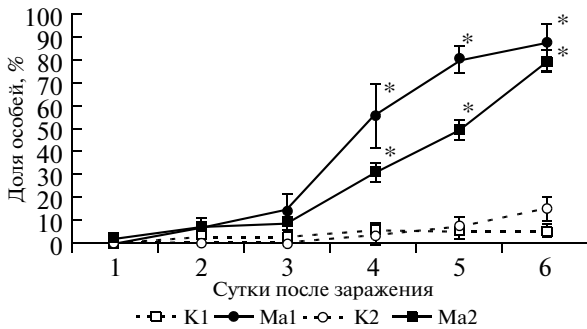


Рис. 1. Динамика гибели личинок перелетной саранчи (*Locusta migratoria*) младших и старших возрастов при инфицировании энтомопатогенным грибом *M. anisopliae*: K1- смертность нативных личинок младших возрастов; Ma1- смертность личинок младших возрастов, зараженных грибом; K2- смертность нативных личинок старших возрастов; Ma2- смертность личинок старших возрастов, зараженных грибом (* $p < 0.05$ по сравнению с контролем).

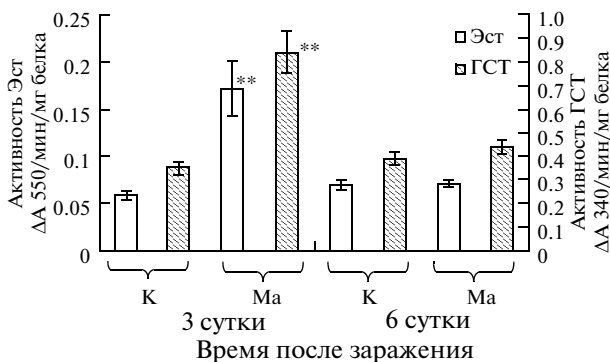


Рис. 2. Активность неспецифических эстераз (Эст) и глутатион-S-трансферазы (ГСТ) в гомогенатах из целого тела нативных личинок перелетной саранчи (*Locusta migratoria*) младших возрастов (К) и то же при заражении энтомопатогенным грибом *M. anisopliae* (Ma) ($n = 10$, ** $p < 0.001$ по сравнению с контролем).

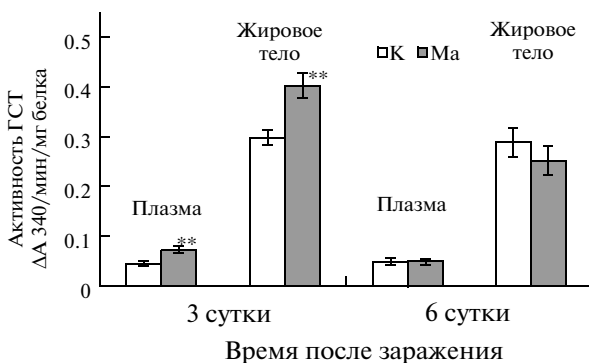


Рис. 3. Активность глутатион-S-трансферазы (ГСТ) в плазме гемолимфы и жировом теле перелетной саранчи (*Locusta migratoria*) старших возрастов на различных этапах развития грибной инфекции: К-активность фермента у нативных личинок; Ma –активность фермента у личинок, зараженных грибом *M. anisopliae* ($n = 20$, ** $p < 0.001$ по сравнению с контролем).

критерию Стьюдента с помощью программы STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате заражения личинок перелетной саранчи грибом *M. anisopliae* зафиксировано развитие инфекционного процесса с суммарной смертностью к 6–7 суткам $81.5 \pm 2.7\%$ личинок младших возрастов и $87.1 \pm 8.3\%$ личинок старших возрастов (рис. 1). К третьим суткам развития заболевания смертность зараженных насекомых обеих групп составляла 10–15% и достоверно не отличалась от контроля (рис. 1). Данный факт позволяет выделить третьи сутки как “начальный” период развития инфекции. Общая динамика смертности насекомых свидетельствует о развитии “острого” грибного патогенеза.

Установлено, что воздействие гриба сопровождается активацией детоксицирующих ферментов на третьи сутки развития болезни. При анализе активности неспецифических эстераз и ГСТ в гомогенатах целого тела личинок перелетной саранчи младших возрастов зафиксировано достоверное ($p \leq 0.001$) двухкратное увеличение активности эстераз на третьи сутки после заражения (рис. 2). Также отмечено 2.5-кратное ($p \leq 0.001$) увеличение активности ГСТ (рис. 2). У личинок старших возрастов при заражении *M. anisopliae* зафиксировано достоверное увеличение активности неспецифических эстераз и ГСТ в плазме гемолимфы в 1.7 раза и 2 раза ($p \leq 0.001$), соответственно, в жировом теле – увеличение активности неспецифических эстераз в 1.3 раза, ГСТ в 1.4 раза ($p \leq 0.001$) (рис. 3, 4).

Активация компонентов детоксицирующей системы на начальном этапе развития “острой” грибной инфекции (ЛД₈₀) может свидетельствовать об участии неспецифических эстераз и ГСТ в защитных реакциях насекомых, направленных на разрушение токсинов энтомопатогенных грибов. Ранее сходные результаты получены при изучении роли неспецифических эстераз при развитии микозов на личинках вошиной огневки (*Galleria mellonella*). В частности, установлено, что инфицирование насекомых энтомопатогенными грибами сопровождается резким увеличением активности неспецифических эстераз и ГСТ в плазме гемолимфы. Повышение активности неспецифических эстераз происходит за счет индукции дополнительных изоферментов (Серебров и др., 2001). Также при исследовании активности кислых фосфатаз при развитии микоза на пустынной саранче (*Schistocerca gregaria* Forsk.) отмечено увеличение активности ферментов в гемолимфе (Xia et al., 2000). Возможно, основным фактором, приводящим к повышению активности детоксицирующих ферментов при микозах, является механическое повреждение тканей кутикулы насекомых гифальными телами грибов при их проникнове-

нии в организм хозяина, и воздействие токсинов гриба, проникающих в гемоцель насекомого (Xia et al., 2000; Серебров и др., 2001, 2006).

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

К 6-м суткам развития микоза, в “острый” период, у зараженных насекомых наблюдалось падение активности ферментов до контрольных значений, в частности, зафиксировано снижение активности неспецифических эстераз и ГСТ в гомогенатах из целого тела личинок младших возрастов (рис. 2). Анализ ферментативной активности у личинок старших возрастов показал снижение активности ГСТ до контрольных значений в плазме и жировом теле (рис. 3), а также эстераз в жировом теле на 6-е сутки после заражения (рис. 4). Отмечено 1.6-кратное достоверное ($p \leq 0.001$) снижение активности эстераз в плазме зараженных насекомых (рис. 4).

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 пустынной саранчи при развитии микоза *M. anisopliae*. В частности, установлено резкое снижение активности фенолоксидаз, антибактериальной активности и общего числа гемоцитов у зараженных насекомых (Gillespie et al., 2000).

Исходя из полученных данных, можно предположить, что детоксицирующая система саранчовых участвует в защитных реакциях против энтомопатогенных грибов. 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 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ (09-04-00380), гранта “Инте-

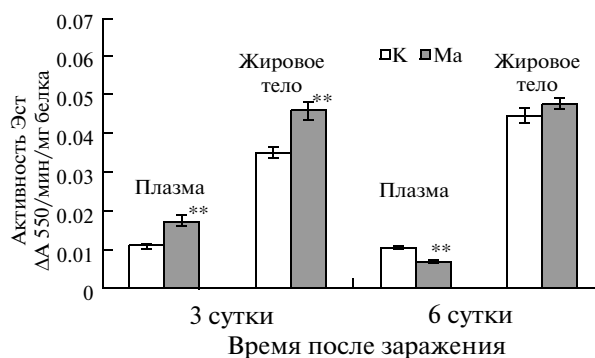


Рис. 4. Активность неспецифических эстераз (Эст) в плазме гемолимфы и жировом теле перелетной саранчи (*Locusta migratoria*) старших возрастов на различных этапах развития грибной инфекции: К – активность ферментов у нативных личинок; Ма – активность ферментов у личинок, зараженных грибом *M. anisopliae* ($n = 20$, ** $p < 0.001$ по сравнению с контролем).

грация” СО РАН (46), грантов Президента РФ и Комитета науки МСХ Республики Казахстан.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баканова Е.И., Еремина О.Ю., Рославцева С.А., 1992. Свойства и функции глутатион-S-трансферазы членистоногих // Изв. РАН. Сер. биол. № 4. С. 537–545.
- Воронцова Я.Л., Еришов Н.И., Глузов В.В., 2006. Влияние микроспоридии *Vairimorpha ephestiae* (Microsporidia: Vurenellidae) на активность и спектр неспецифических эстераз различных тканей личинок большой пчелиной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) // Паразитология. Т. 40. № 1. С. 74–84.
- Глузов В.В., 2001. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год. 725 с.
- Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., 1989. Глутатион-трансферазы // Успехи совр. биол. Т. 107. Вып. 2. С. 179–194.
- Рославцева С.А., Баканова Е.И., Еремина О.Ю., 1993. Эстеразы членистоногих и их роль в механизмах детоксикации инсектоакарицидов // Изв. РАН. Сер. биол. № 3. С. 368–375.
- Серебров В.В., Алексеев А.А., Глузов В.В., 2001. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц вошинной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) при микозах // Изв. РАН. Сер. биол. № 5. С. 588–592.
- Серебров В.В., Гербер О.Н., Малярчук А.А., Мартынянов В.В., Алексеев А.А., Глузов В.В., 2006. Влияние энтомопатогенных грибов на активность детоксицирующих ферментов гусениц пчелиной огневки, *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae), и роль детоксицирующих ферментов при формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам // Изв. РАН. Сер. биол. № 6. С. 581–586.
- Серебров В.В., Киселев А.А., Глузов В.В., 2003. Изучение некоторых факторов синергизма между энтомопа-

- тогенными грибами и химическими инсектицидами // Микол. и фитопатол. Т. 1. Вып. 37. С. 76–82.
- Asperen K. Van., 1962. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method // J. Insect Physiol. V. 8. P. 401–416.
- Charnley A.K., 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins // Adv. Botan. Res. V. 40. P. 241–321.
- Field L.M., 2000. Methylation and expression of amplified esterase genes in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) // Biochem. J. V. 349. P. 863–868.
- Field L.M., Devonshire A.L., 1998. 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. V. 330. P. 169–173.
- Gillespie J.P., Burnett C., Charnley A.K., 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum* // J. Insect Physiol. V. 46. P. 429–437.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974. Glutathione-S-transferases // J. Biol. Chem. V. 249. P. 7130–7139.
- Hajek A.E., Leger R.J., 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts // Annu. Rev. Entomol. V. 39. P. 293–322.
- Hawkes N.J., Hemingway J., 2002. Analysis of the promoters for the β -esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* // Biochim. Biophys. Acta. V. 1574. P. 51–62.
- Hemingway J., Hawkes N., Prapanthadara L., Jayawardena K.G.I., Ranson H., 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance // Philos. Trans. R. Soc. London. B. V. 353. P. 1695–1699.
- James P.J., Charnley A.K., Reynold S.E., 1994. The effect destruxins on the structure and function of insect malpighia tubus // IOBC WPRS Bul. V. 17. P. 218–221.
- Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K., 1988. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae* // J. Invertebr. Pathol. V. 52. P. 459–470.
- Li X., Schuler M.A., Berenbaum M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics // Annu. Rev. Entomol. V. 52. P. 231–253.
- Papadopoulos A.I., Boukouvala E., Kakaliouras G., Kostaropoulos J., Papadopoulou-Mourkidou E., 2000. Effect of organophosphate and pyrethroid insecticides on the expression of GSTs from *Tenebrio molitor* pupae // Pesticide Biochem. Physiol. V. 68. P. 26–33.
- Pasteur N., Nance E., Bons N., 2001. Tissue localization of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) // J. Med. Entomol. V. 38. P. 791–801.
- Shiotsuki T., Kato Y., 1999. Induction of carboxylesterase isozymes in *Bombyx mori* by *E. coli* infection // Insect. Biochem. Mol. Biol. V. 29. P. 731–736.
- Small G.J., Hemingway J., 2000. Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* // Insect Mol. Biol. V. 9. P. 647–653.
- Terriere L.C., 1984. Induction of detoxication enzymes in insects // Ann. Rev. Entomol. V. 29. P. 71–88.
- Vilcinskas A., Jegorov A., Landa Z., Götz P., Matha V., 1999. Effect of beauverolide L and cyclosporin A on humoral and cellular immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella* // Comp. Biochem. Physiol. V. 122. P. 83–92.
- Xia Y., Dean P., Judge A.J., Gillespie J.P., Clarkson J.M., Charnley A.K., 2000. Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* // J. Insect Physiol. V. 46. P. 1249–1257.

ACTIVITY OF NONSPECIFIC ESTERASES AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASE OF *LOCUSTA MIGRATORIA* LARVAE IN INFECTION WITH *METARHIZIUM ANISOPLIAE* FUNGUS (ASCOMYCOTA, HYPOCREALES)

I. M. Dubovskiy¹, N. D. Slyamova², V. Yu. Kryukov¹, O. N. Yaroslavtseva¹,
M. V. Levchenko³, A. B. Belgibaeva², A. Adilkhankyzy², V. V. Glupov¹

¹ Institute of Animal Systematics and Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk 630091, Russia

² Research Institute of Plant Protection, Rakhat, Karasaiskiy district, Almaty 040924, Kazakhstan

³ All-Russian Institute of Plant Protection, Russian Academy of Agricultural Sciences, St. Petersburg, Pushkin 196608, Russia.
e-mail: dubovskiy2000@yahoo.com

The activity of nonspecific esterases and glutathione-S-transferase in the whole body homogenate, plasma and fat body of locusts (*Locusta migratoria* L.) was studied in the development of fungus (*Metarhizium anisopliae*) infection. A lethal dose of the fungus (LC₈₀) was found to enhance the activity of detoxificative enzymes in the whole body homogenate of insects on the third day after infection. The activity of nonspecific esterases and glutathione-S-transferase in plasma and fat body of the infected locusts increased on the third day. On the sixth day during the acute period of infection, a decrease in the activity of enzymes was determined. The enhanced activity of the detoxification enzymes at the early stage of the fungus infection may be an evidence of the participation of these enzymes in defensive reactions against fungal pathogens.