

УДК 595.78

Реакция китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) на воздействие ксенобиотиков в зависимости от кормового растения

С.И. Денисова, С.М. Седловская, Н.А. Степанова, В.Л. Сурвило,
Н.В. Ковганко

Изучена возможность использования культуры китайского дубового шелкопряда для биологического мониторинга химического загрязнения окружающей среды. Установлено, что агонисты экдистероидов 1,2-бис-(3-метоксибензоил)-1-трет-бутилгидразина (R-209) и 1-(2-метоксибензоил)-2-(3-метоксибензоил)-1-трет-бутилгидразина (R-213) 1%-ной концентрации при попадании в организм гусениц с листом дуба и березы оказывают инсектицидное действие. Самая высокая смертность и самая низкая скорость роста гусениц наблюдается под воздействием R-209 при питании листом березы. Анализ биохимических показателей состояния гемолимфы куколок шелкопряда показал уменьшение числа белковых фракций, активности фермента аланинаминотрансферазы, содержания белка и увеличение концентрации билирубина в гемолимфе опытных куколок на березе под влиянием R-209 по сравнению с дубом, что также указывает на усиление отрицательного воздействия агониста – R-209 на организм шелкопряда при питании листом березы. Следовательно, кормовое растение оказывает влияние на реакцию организма шелкопряда по отношению к агонистам экдистероидов R-209 и R-213: питание листом дуба ослабляет отрицательное воздействие агонистов, питание листом березы усиливает. Такой эффект, возможно, достигается в результате большей питательной ценности листа дуба по сравнению с листом березы, так как лист дуба содержит больше растворимых углеводов и свободных аминокислот, а также обладает более оптимальным соотношением белковых и углеводных соединений.

Введение. Китайский дубовый шелкопряд (*Antheraea pernyi* G.-M.) – практически ценный вид, имеющий промышленное значение, так как натуральные шелковые ткани, изготовленные из коконов дубового шелкопряда в Китае, вне конкуренции. Китаю принадлежит 90% мировой продукции коконов этого шелкопряда. Куколка шелкопряда может служить исходным сырьем для получения различных лечебных, косметических средств, пищевых продуктов (масла, приправы) и применяться в качестве кормовых добавок для домашних животных, птицы, рыбы. В УО «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова» на кафедре зоологии в течение 30 лет разводится культура китайского дубового шелкопряда [1; 2] на разных кормовых растениях: береза повислая или бородавчатая (*Betula pendula* Roth.) и дуб черешчатый (*Quercus robur* L.).

Культура данного насекомого может служить объектом для изучения влияния кормового растения и различных биологически активных соединений на физиологиче-

ские и биохимические процессы в организме чешуекрылых, что может служить для мониторинга загрязнения окружающей среды ксенобиотиками. В настоящее время общепризнано, что химизм растений обусловлен как пищевой ценностью, так и другими химическими факторами. Однако обычно определяющим фактором служат вторичные соединения, так как по питательной ценности растения отличаются не очень сильно. Хотя уровень содержания азота может быть фактором, лимитирующим скорость роста и степень размножения популяции фитофага [3]. Главной вкусовой ответной реакцией насекомых является реакция на сладость, поэтому наличие сахаров, всегда присутствующих в тканях листа, – это основное требование, предъявляемое к пище. Важно также, чтобы пища удовлетворяла потребности насекомых в стеринах, необходимых для синтеза их гормонов линьки и метаморфоза экдистероидов [18], т.е. химизм кормового растения определяет пищевые стратегии и эволюцию растительноядных насекомых.

В настоящее время ведутся исследования по использованию фитоэкдистероидов и их аналогов в качестве потенциальных инсектицидов, которые по механизму действия относятся к регуляторам роста насекомых [4]. В конце 80-х годов прошлого столетия обнаружили, что гормональной активностью для насекомых обладают вещества, не похожие на экдистероиды по строению и относящиеся к ацилпроизводным гидразина. Биологические испытания соединений данной группы стали проводиться сразу же после установления их гормональной активности [5].

Отмечено их влияние на смертность, длительность личиночного развития, массу гусениц, массу шелкоотделительной железы и состав белков гемолимфы [6; 7].

В связи с вышеизложенным целью нашей работы является изучение влияния химизма кормовых растений и ксенобиотиков – агонистов экдистероидов группы гидразинов 1,2-бис-(3-метоксибензоил)-1-трет-бутилгидразина (R-209) и 1-(2-метоксибензоил)-2-(3-метоксибензоил)-1-трет-бутилгидразина (R-213) на физиолого-биохимические показатели жизнедеятельности китайского дубового шелкопряда после потребления корма, обработанного данными веществами.

Материал и методика исследований. Работа выполнялась на биологическом стационаре «Щитовка» в Сенненском районе Витебской области на протяжении летнего периода 2006–2007 гг., а также в лабораториях кафедры зоологии и химии УО «ВГУ им. П.М. Машерова».

В качестве объекта исследований использовали китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.). Кормовыми растениями служили дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) и береза бородавчатая (*Betula pendula* Roth.).

В работе в качестве модельных ксенобиотиков использовали агонисты экдистероидов, синтезированные в лаборатории химии экдистероидов Института биоорганической химии НАН РБ под руководством доктора химических наук Н.В. Ковганко.

Корм одинаковой массы для гусениц пятого возраста обрабатывали однократно водными растворами 1,2-бис-(3-метоксибензоил)-1-трет-бутилгидразина (R-209) 1%-ной концентрации и 1-(2-метоксибензоил)-2-(3-метоксибензоил)-1-трет-бутилгидразина (R-213) 1%-ной концентрации объемом 2 мл один раз и скормливали в начале опыта. Наблюдали за гусеницами с начала V возраста до завивки коконов.

Обработку корма проводили методом опрыскивания листьев. Для приготовления рабочих растворов навеску 100 мг (1%) соединения помещали в мерную пробирку, добавляли 0,5 мл этанола, доводили общий объем до 10 мл дистиллированной водой, в которую предварительно добавляли ПАВ ОП-10 (1 капля на 1 л воды). Контроль – дистиллированная вода с добавлением этанола (0,5 мл/10 мл воды) и ПАВ ОП-10 (1 капля/1 л воды). Опытные и контрольные гусеницы содержались в одинаковых емкостях объемом 3000 см³ при температуре 20–22°C, относительной влажности воздуха 70–80% и одинаковых условиях освещенности. Гусеницы пятого возраста в опыте питались обработанным кормом в течение трех суток. Через трое суток обработанные листья дуба и березы заменяли на свежие необработанные и дальше кормили только свежим необработанным кормом.

Опыт проводили в трех повторностях каждый (по 30 гусениц в повторности).

Образцы листьев для химического анализа заготавливали следующим образом: 300 г листа, собранного со всех сторон кроны дерева, запаривали на водяной бане до исчезновения зеленого цвета, затем высушивали в темноте и размалывали на мельнице ЛЗМ.

Таблица 1

Схема опыта по определению влияния обработки корма для гусениц на физиолого-биохимические показатели развития дубового шелкопряда

№ п/п	Варианты опыта	Количество		
		повторностей	гусениц в повторности	общее
Дуб				
1.	Обработка корма для гусениц V возраста 1%-ми растворами R-209 и R-213	3	30	90
2.	Контроль	3	30	90
Береза				
1.	Обработка корма для гусениц V возраста 1%-ми растворами R-209 и R-213	3	30	90
2.	Контроль	3	30	90

В навесках листьев и экскрементов определялись первоначальная и гигроскопическая влага, зола, общий азот и белковый по Кьельдалю, растворимые сахара по Бертрану, содержание общих липидов по Сокслету, содержание аминокислот методом бумажной хроматографии [8]. В листьях и экскрементах определялось содержание таннинов [9], алкалоидов, фенолов, пирогаллола, пирокатехина [10], цианогенных глюкозидов [11].

Выживаемость гусениц определялась по формуле:

$$Ж = \frac{Л \cdot 100}{Г} \%, \text{ где}$$

Ж – жизнеспособность гусениц в процентах;

Л, Г – количество гусениц соответственно в начале и конце возраста.

Смертность гусениц определялась в процентах к начальному количеству гусениц. Удельную скорость роста рассчитывали по формуле, предложенной в работе И.И. Шмальгаузена [12]:

$$\frac{\lg V_2 - \lg V_1}{l(t_2 - t_1)}, \text{ где}$$

V_1 – начальная масса гусениц;

V_2 – конечная масса гусениц;

t_1 – начальное время взвешивания;

t_2 – конечное время взвешивания;

l – модуль перевода натурального логарифма в десятичный (0,4343).

Масса коконов и шелковой оболочки определялась после впадения куколок в диапаузу, т.к. к этому времени масса кокона стабилизируется. Для взвешивания использовались полуаналитические весы ВЛК-500. Шелконосность коконов выражалась отношением массы оболочки к массе сырого кокона в процентах. Содержание растворимых белков в гемолимфе куколок определяли методом Лоури. Измерения содержания триацилглицеролов, глюкозы, билирубина и активности аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы впервые проводились тест-системами фирмы «Rochse» на аппарате «Рефлотрон-4» в гемолимфе диапаузирующих куколок. Фракционный состав растворимых белков изучали методом дискэлектрофореза в ПААГ. Полученный спектр белков на электрофореграмме характеризовали по количеству индивидуальных фракций, их относительной подвижности и интенсивности окраски.

Результаты и их обсуждение. Во взаимодействии растений и животных участвуют вторичные вещества почти всех классов. Они могут играть роль как аттрактантов, так и деттерентов. На примере наиболее изученных по питанию видов: тутового шелкопряда (*Bombix mori* L.), капустницы (*Pieris brassicae* L.) и капустной тли (*Brevicoryne brassicae* L.) выявлено, что ведущую роль в определении питательности растения играют некоторые эфирные масла и флавоноиды, сахароза, аминокислоты. Наряду с этими веществами – аттрактантами, на эффективность питания насекомых сильное влияние оказывают вторичные вещества – деттеренты.

Как и в случае аттрактантов, это могут быть вещества любого типа: от терпеноидов и алкалоидов до хинонов и флавоноидов. Наиболее важными средствами защиты покрытосеменных от поедания насекомыми-фитофагами являются алкалоиды, конденсированные, гидролизруемые танины, и в целом фенолы [3].

Вот почему мы решили определить содержание данных веществ в листьях дуба черешчатого и березы повислой в период питания гусениц шелкопряда.

Следует указать на значение экспериментального материала по содержанию вторичных метаболитов в листьях кормовых растений насекомых, обусловленное необходимостью дальнейшего развития теории трофической динамики численности хвое и листогрызущих насекомых. Поэтому представленные нами данные о сезонной динамике вышеуказанных вторичных метаболитов, по нашему мнению, заслуживают внимания.

Анализ полученных данных, приведенных на рис. 1–4, показал, что в листьях дуба черешчатого суммарное количество фенолов и алкалоидов увеличивается, причем возрастание содержания алкалоидов происходит более быстрыми темпами. Если к концу августа количество фенолов возросло по сравнению с июнем на 16,1%, то количество алкалоидов увеличилось за тот же период почти в 10 раз. Содержание гидролизуемых таннинов также возросло за тот же период почти в 3 раза, а количество конденсированных таннинов в 2,5 раза. Что касается фенолов пирогаллола и пирокатехина, то содержание пирокатехина практически не изменилось на протяжении вегетации, а концентрация пирогаллола возросла очень существенно, почти в 10 раз. Таким образом, важнейшие группы аллелохимиков (фенолы, таннины, алкалоиды), оказывающие, согласно данным многих авторов, значительное влияние на процессы питания насекомых-фитофагов, присутствуют в листьях дуба черешчатого и накапливаются к концу вегетативного периода различными темпами.

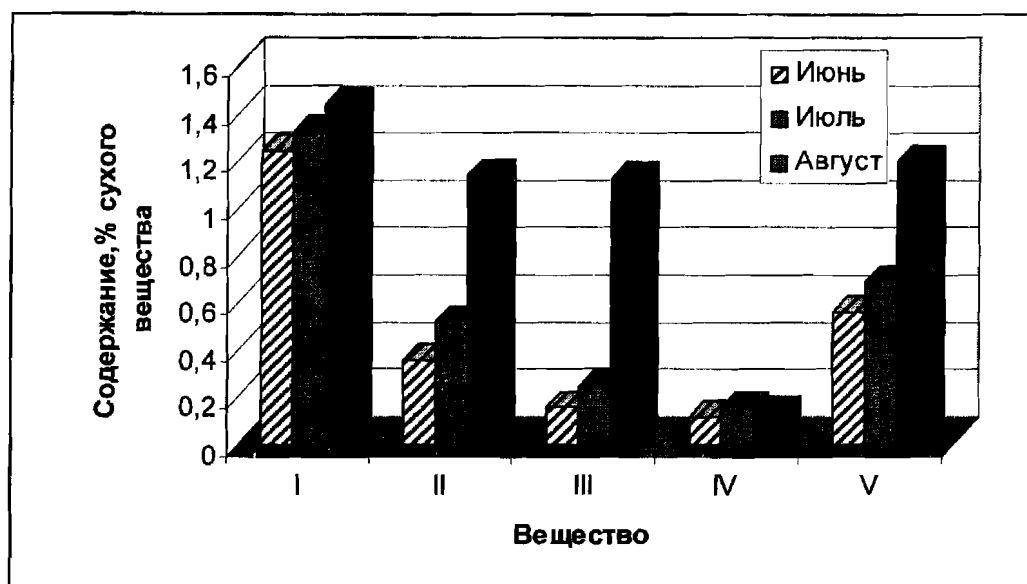


Рис. 1. Сезонное изменение содержания вторичных метаболитов в листьях дуба черешчатого.

I – сумма фенолов; II – гидролизуемые таннины; III – пирогаллол; IV – пирокатехин; V – конденсированные таннины.

Быстрее всех идет накопление алкалоидов, медленнее таннинов, а количество фенолов отличается более высокой концентрацией (их примерно в три раза больше по сравнению с таннинами и алкалоидами, на протяжении всего периода вегетации) и незначительным увеличением содержания к концу вегетационного периода. Сходные данные динамики фенолов, таннинов и алкалоидов у других видов растений получены рядом авторов [13].

Исследование содержания вторичных метаболитов в листьях березы бородавчатой показало, что фенолов в листьях березы меньше, чем в листьях дуба в среднем за исследуемый период в 2 раза, но тенденция к их возрастанию к концу лета также четко выражена, как и у дуба. Увеличение концентрации фенолов происходит несколько интенсивнее. К концу лета, в августе, количество фенолов в листьях березы увеличивается на 29,2%, а в листьях дуба, как уже указывалось, лишь на 16,1%.

Алкалоидов (рис. 4) в листьях березы также меньше, чем в листьях дуба на протяжении всех летних месяцев. Причем июньский лист, как березы, так и дуба, содержит минимальное количество алкалоидов, но в листьях березы их меньше в 3,5 раза. Июльский лист березы содержит алкалоидов в 16 раз меньше, чем у дуба, а августовский – в 10 раз меньше. И скорость накопления их у березы меньше, чем у дуба. В листьях березы концентрация алкалоидов к концу августа увеличивается примерно в 3 раза, а в листьях дуба – в 10 раз.

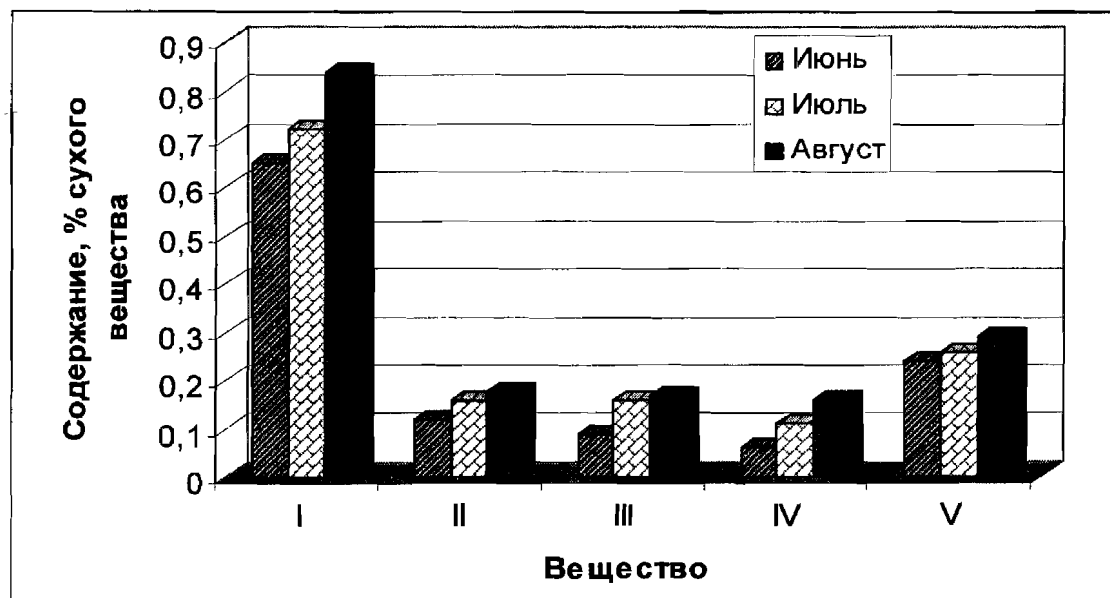


Рис. 2. Сезонное изменение содержания вторичных метаболитов в листьях березы бородавчатой.

I – сумма фенолов; II – гидролизуемые таннины; III – пирогаллол; IV – пирокатехин; V – конденсированные таннины.

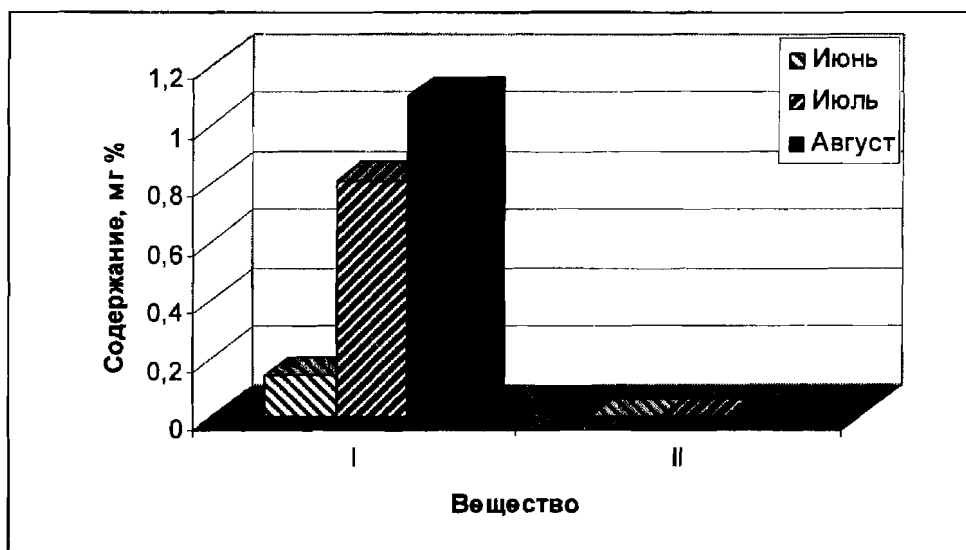


Рис. 3. Сезонная динамика содержания алкалоидов и цианогенных глюкозидов в листьях дуба черешчатого.

I – сумма алкалоидов; II – цианогенные глюкозиды.

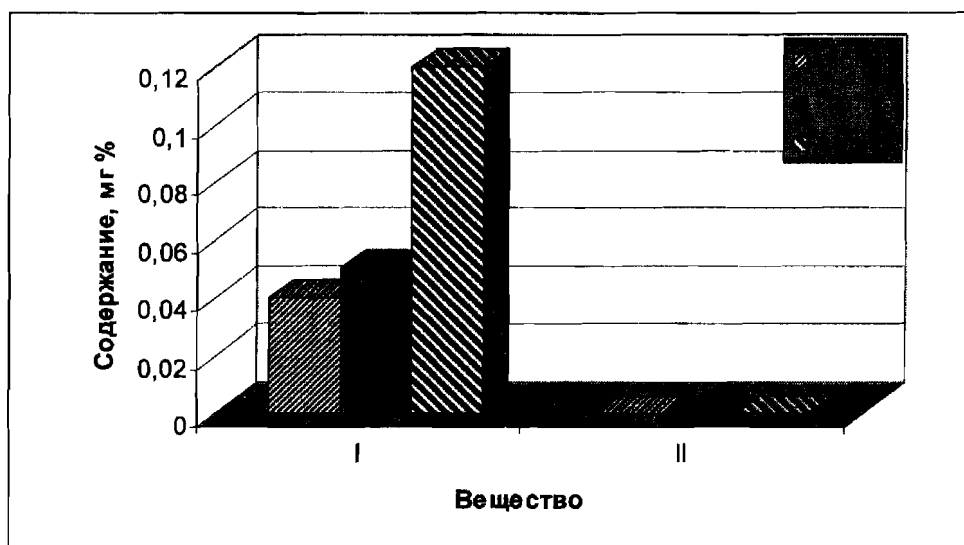


Рис. 4. Сезонная динамика содержания алкалоидов и цианогенных глюкозидов в листьях березы бородавчатой.

I – сумма алкалоидов; II – цианогенные глюкозиды.

Что касается содержания гидролизуемых и конденсированных танинов в листьях березы, то их концентрация к концу вегетации медленно, но закономерно возрастает. Сравнение данных показателей с аналогичными листья дуба показало, что гидролизуемых танинов в листьях дуба больше, чем в листьях березы: в июне примерно в 3 раза, в июле – в 3,5 раза, а в августе – в 6 раз. Конденсированных танинов также больше в листьях дуба, чем в листьях березы: в июне – в 2,5 раза, в июле – почти в 3 раза, в августе – в 4 раза. Пирогаллола в листьях березы намного меньше, чем у дуба: примерно в 1,5–2 раза в июне и июле и в 6 раз меньше – в августе.

Концентрация пирокатехина у листа березы увеличивается в течение вегетации в 2,5 раза, а у листа дуба содержание пирокатехина сохраняется приблизительно на одном уровне весь вегетационный период. Следует указать на такое различие, если в июне пирокатехина у листа дуба было больше чем у листа березы в 2 раза, то к августу его содержание стало примерно одинаковым. Что касается цианогенных глюкозидов, то нами они не обнаружены ни в листьях дуба, ни в листьях березы, хотя в литературных источниках имеются указания на то, что стареющие листья растений могут накапливать цианогенные глюкозиды [14].

Таким образом, лист березы по сравнению с листом дуба характеризуется меньшим содержанием фенольных соединений, алкалоидов и танинов. Согласно взглядам многих исследователей эффективность утилизации и использования корма на рост тела насекомых зависит от обводнения растительных тканей [15], соотношения основных групп питательных веществ [16]. Некоторые считают, что высокая питательная ценность листьев компенсирует любые отрицательные эффекты, связанные с присутствием вторичных метаболитов [17].

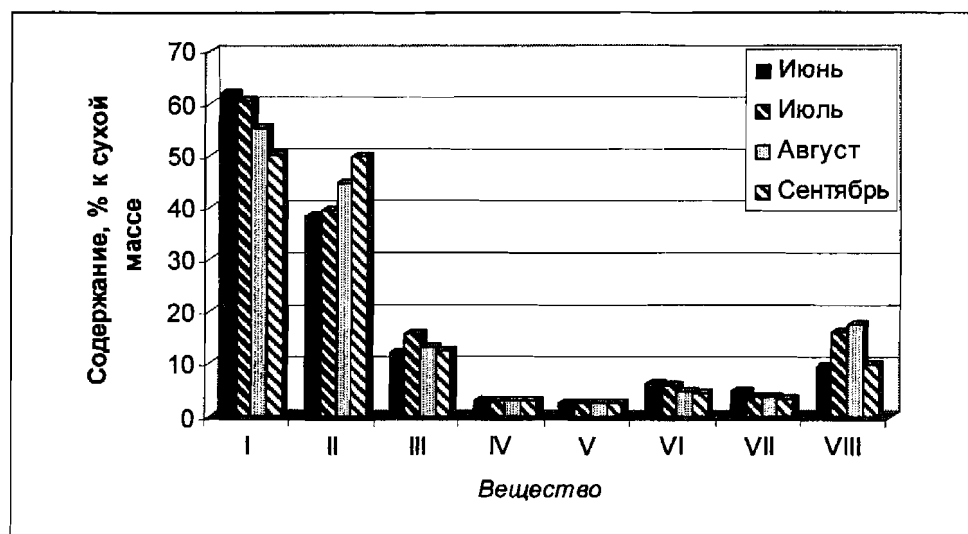


Рис. 5. Содержание первичных метаболитов в листьях дуба черешчатого на протяжении вегетации.

I – вода; II – сухое вещество; III – растворимые углеводы; IV – общий азот; V – белковый азот; VI – зола; VII – жиры; VIII – свободные аминокислоты.

Нами было проведено определение содержания основных питательных веществ в кормовых растениях шелкопряда на протяжении вегетации (рис. 5–6). Исходя из данных рис. 5–6 следует отметить, что в начале и в конце вегетационного периода концентрация растворимых углеводов, свободных аминокислот, жиров и воды в листьях всех растений характеризуется минимальными значениями, количество общего и белкового азота в листьях дуба и березы практически не изменяется. Зольность листьев всех растений к концу вегетации незначительно понижается.

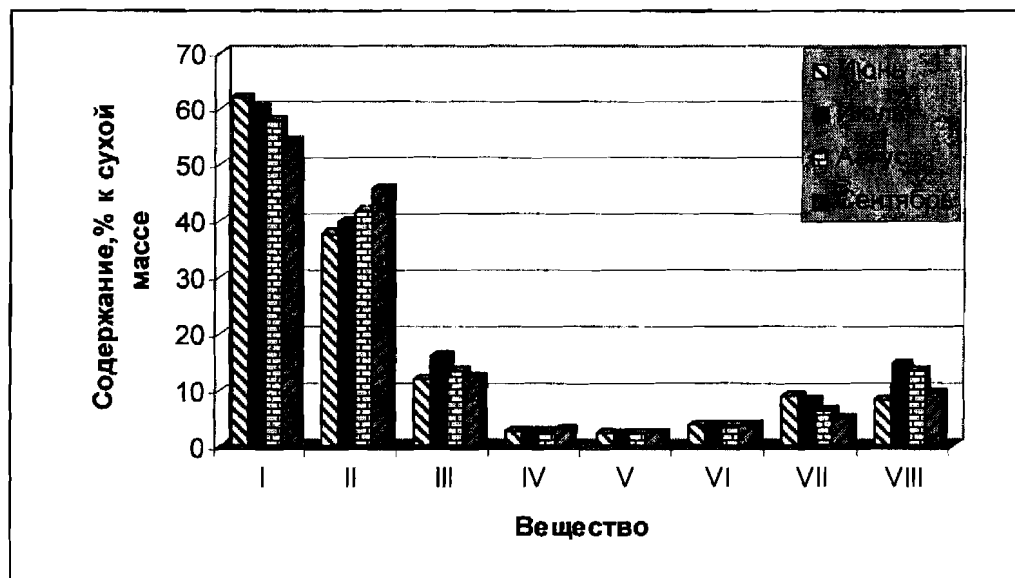


Рис. 6. Содержание первичных метаболитов в листьях березы бородавчатой на протяжении вегетации.

I – вода; II – сухое вещество; III – растворимые углеводы; IV – общий азот; V – белковый азот; VI – зола; VII – жиры; VIII – свободные аминокислоты.

Таким образом, установлено, что к концу вегетации в листьях дуба и березы накапливаются алкалоиды, фенолы и танины, но у дуба этот процесс протекает на более высоком уровне и более быстрыми темпами, чем у березы. Лист всех кормовых растений имеет тенденцию уменьшения концентрации воды, растворимых углеводов, жиров и свободных аминокислот к концу вегетации, но лист березы содержит больше жиров по сравнению с листом дуба, а лист дуба достоверно превышает лист березы по содержанию свободных аминокислот и растворимых сахаров.

Нами проведено экспериментальное сравнение показателей питания гусениц дубового шелкопряда за весь период развития при питании листом дуба и березы (табл. 2).

Таблица 2

**Индексы питания гусениц дубового шелкопряда на разных
кормовых растениях**

Кормовое растение	Период активности питания	Прирост, г сухой массы/ особь	Кормовой рацион, г/экз.		Усвоено корма, г сухой массы/экз.	Коэффициент утилизации, % (КУ)	Эффективность использования на прирост массы, %	
			сырая масса	сухая масса			потребленного корма (ЭИП)	усвоенного корма (ЭИУ)
Дубовый шелкопряд								
Дуб	28,5±0,6	5,6±0,2	77,6±1,9	41,3±0,3	17,1±0,1	39,6±0,4	12,6±0,2	32,8±0,1
Береза	33,1±0,2	6,1±0,1	109,3±1,2	56,7±0,5	24,5±0,1	42,3±0,6	10,8±0,1	24,9±0,2

Анализ данных табл. 2 показал, что, несмотря на самое высокое содержание таннинов, алкалоидов и фенолов в листьях дуба черешчатого, дубовый шелкопряд имеет самые лучшие показатели питания и использования усвоенной пищи на рост и развитие именно при питании листом дуба черешчатого (ЭИП – 12,6%, ЭИУ – 32,8%) по сравнению с березой повислой (ЭИП – 10,8%, ЭИУ – 24,9%). Этот результат достигается при меньших затратах листа дуба на создание массы тела гусениц примерно на 16 г/особь.

Итак, лист дуба характеризуется наиболее оптимальными значениями углеводно-белкового баланса (табл. 3), более высоким содержанием свободных аминокислот, растворимых сахаров, таннинов, фенолов и алкалоидов (рис. 5) и, возможно, еще какими-то не установленными факторами, делающими данный вид корма самым привлекательным для дубового шелкопряда.

Таблица 3

Углеводно-белковое соотношение в листьях кормовых растений на протяжении вегетации

Растения	Углеводно-белковое соотношение			
	июнь	июль	август	сентябрь
Дуб	0,9:1	1,07:1	0,92:1	0,84:1
Береза	0,8:1	1,08:1	0,85:1	0,51:1

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что пищевая ценность кормового растения для дубового шелкопряда определяется не только количест-

вом, но и, возможно, специфичным сочетанием первичных и вторичных метаболитов в листьях дуба и березы.

Одной из задач настоящей работы является изучение влияния химизма кормового растения на реакцию организма дубового шелкопряда по отношению к агонистам экдистероидов. Существует точка зрения, согласно которой присутствие экдистероидов в растениях обусловлено их защитной функцией против поедания растительноядными насекомыми [18].

Установлено, что агонисты экдистероидов оказывают свое токсическое действие на все стадии развития насекомых, но наиболее чувствительными оказываются личинки [19; 20]. Следует отметить, что характер действия агонистов экдистероидов отличается сложностью и сильно зависит от конкретного вида насекомого. Однако в целом попадание указанных соединений в организмы насекомых приводит либо сразу к их гибели, либо сопровождается значительными нарушениями процессов нормального роста и развития, даже спустя несколько поколений [7].

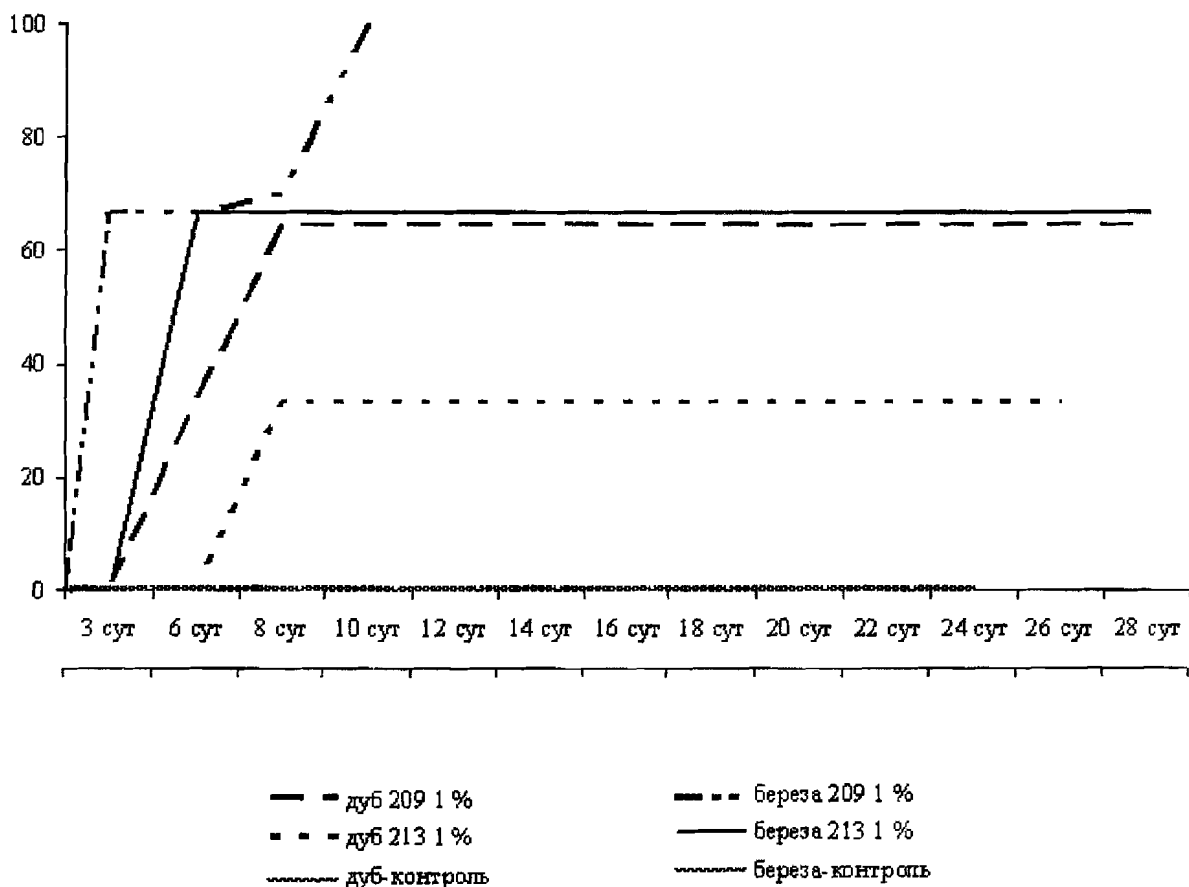


Рис. 7. Смертность гусениц китайского дубового шелкопряда V возраста после потребления обработанного агонистами экдистероидов корма.

В нашем опыте потребление в пищу обработанного агонистами экдистероидов корма увеличило гибель гусениц шелкопряда. Динамику смертности гусениц в течение V возраста отражает рис. 7. Смертность в опыте на двух кормовых растениях достаточно высокая по сравнению с контролем (в контроле не погибло ни одной гусеницы). Гусеницы, питавшиеся листом дуба (рис. 7), обработанным R-209, начали гибнуть на 6 сутки после закладки опыта – погибло 33,3% гусениц, а на 8 сутки гибель гусениц достигла 66,6% по сравнению с контролем. На березе погибли все гусеницы в течение 10 суток. Оставшиеся на дубе в живых гусеницы продолжали питаться, расти и смогли завить коконы к концу развития. Попадание в организм гусениц вместе с кормом R-213 вызвало на дубе гибель 33% особей, а на березе – 66,6%. Этот эффект зависит от вида кормового растения и на дубе ослабляется, а на березе усиливается. Таким образом, оба биологически активных вещества оказали токсическое действие на гусениц V возраста на двух кормовых растениях, но наиболее сильный инсектицидный эффект оказало вещество R-209 на березе. Следует отметить, что уже на 9-е сутки после закладки опыта гусеницы смогли адаптироваться к воздействию вышеуказанных агонистов экдистероидов, так как смертности гусениц до конца развития больше не наблюдалось. На рис. 7 это отражает плато – отрезок, параллельный оси абсцисс.

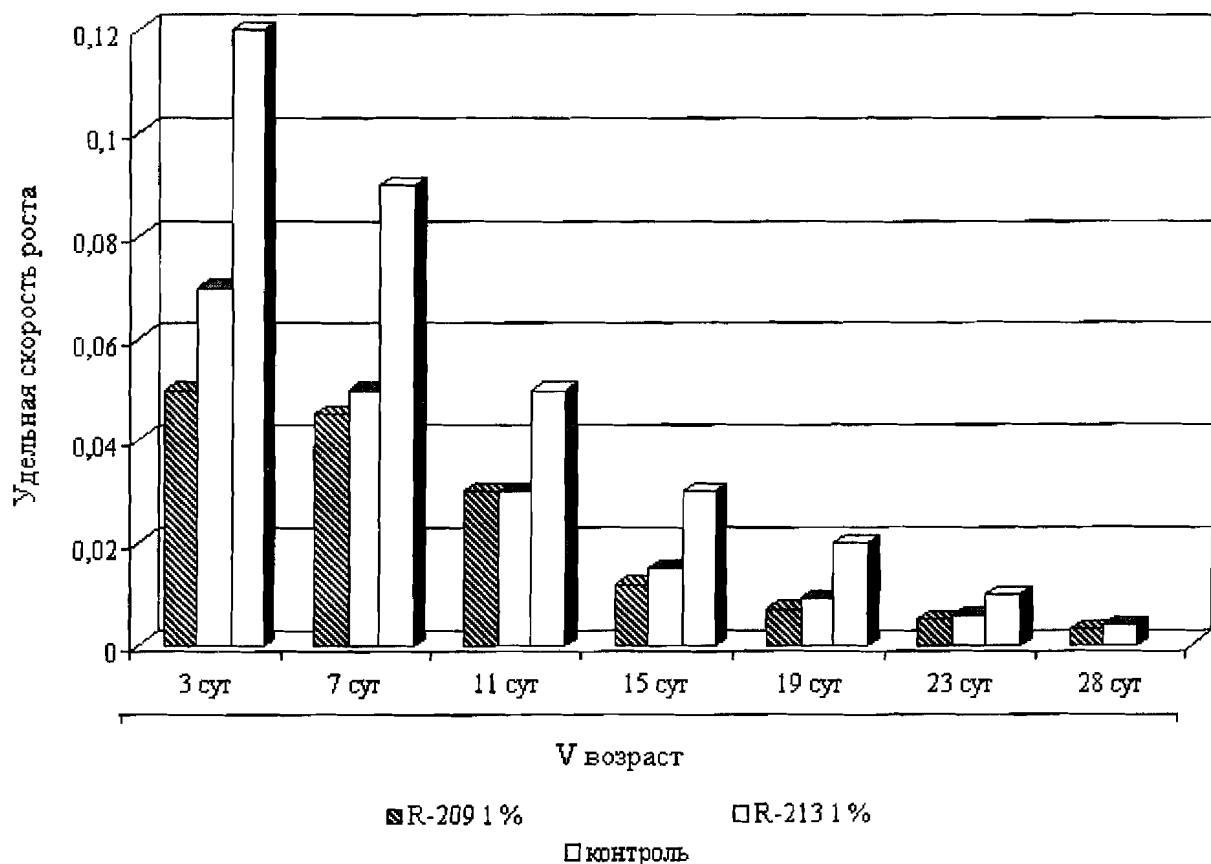


Рис. 8. Удельная скорость роста гусениц китайского дубового шелкопряда V возраста после потребления обработанного агонистами экдистероидов листа дуба.

Темп роста насекомых является важным показателем физиологического состояния организма, а также показателем условий питания гусениц [21]. Удельная скорость роста, или интенсивность роста, – это приращение единицы живой массы за единицу времени [12]. Она дает дополнительную информацию о процессах роста организма. Удельная скорость роста у животных закономерно снижается к концу развития. Эта общебиологическая закономерность отражена и в наших данных (рис. 8, 9).

Согласно данным рис. 8 у гусениц на дубе скорость удельного роста после потребления корма, обработанного R-209, в течение V возраста в среднем на 55% ниже, чем в контроле. В случае с березой соединение R-209 вызвало 100%-ную гибель особей. В варианте с R-213 удельная скорость роста гусениц после обработки листа дуба ниже примерно на 45% по сравнению с контролем. Вещество R-213 на березе также привело к снижению интенсивности роста – в течение V возраста на 40% по сравнению с контролем.

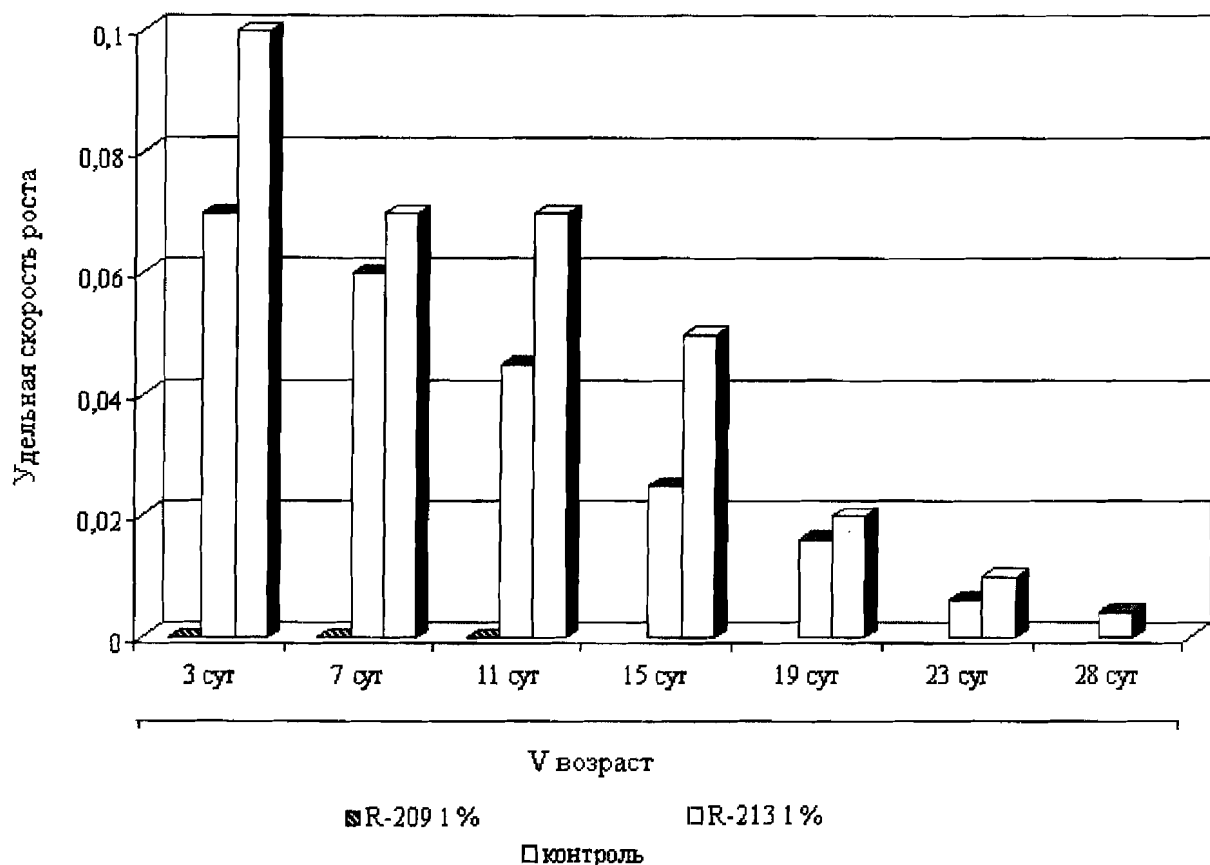


Рис. 9. Удельная скорость роста гусениц китайского дубового шелкопряда V возраста после потребления обработанного агонистами экдистероидов листа березы.

Итак, в опыте на дубе после воздействия R-209 удельная скорость роста ниже на 55% по сравнению с контролем, а на березе все гусеницы погибли. Воздействие R-213 к

концу развития гусениц вызвало снижение скорости удельного роста на дубе на 45%, а на березе – на 40% по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные данные о более высоких темпах снижения скорости роста гусениц дубового шелкопряда под воздействием агониста R-209 по сравнению с воздействием R-213 согласуются с данными о наиболее высокой смертности опытных гусениц, питавшихся кормом, обработанным R-209. Происходит усиление токсичности обоих агонистов при воспитании гусениц на березе.

Потребление корма, обработанного биологически активными веществами, оказало влияние и на качество коконов дубового шелкопряда (табл. 4).

Таблица 4

Влияние обработки корма для гусениц V возраста агонистами экидистероидов на качество коконов китайского дубового шелкопряда

Вариант опыта	Масса коконов, г	Масса шелковой оболочки, г	% шелконосности
Дуб			
R-209 1%	$4,25 \pm 0,15^*$	$0,38 \pm 0,03^*$	$8,94 \pm 0,12^*$
R-213 1%	$4,42 \pm 0,05^*$	$0,39 \pm 0,08^*$	$8,82 \pm 0,13^*$
Контроль	$5,83 \pm 0,07$	$0,55 \pm 0,04$	$9,43 \pm 0,20$
Береза			
R-209 1%	–	–	–
R-213 1%	$5,71 \pm 0,14$	$0,53 \pm 0,04^*$	$9,28 \pm 0,17^*$
Контроль	$6,35 \pm 0,11$	$0,66 \pm 0,09$	$10,39 \pm 0,14$

*Примечание: результаты статистически достоверны ($P \leq 0,01$).

Так, в опыте на дубе под воздействием R-209 масса коконов на 28% ниже, чем на контроле, а шелконосность – на 6%, а на березе гусеницы все погибли. Соединение R-213 на дубе вызвало снижение массы коконов на 25%, шелконосности – на 7% по сравнению с контролем. В опыте на березе под влиянием вещества R-213 масса коконов снизилась на 11% и шелконосность на 11% по сравнению с таковыми на контроле. После потребления листа дуба, обработанного R-213, масса коконов оказалась на 14% выше по сравнению с таковой на березе, а шелконосность на 3% ниже.

Итак, вещества R-209 и R-213 снижают шелкопродукцию дубового шелкопряда примерно на 25% и их воздействие зависит от вида кормового растения. Так, на дубе масса коконов на 14% превышает таковую на березе в варианте воздействия R-213.

Таким образом, в результате наших исследований установлено, что агонисты экидистероидов R-209 и R-213 в концентрации 1% обладают инсектицидной активностью по отношению к гусеницам китайского дубового шелкопряда: в опыте на дубе в течение V возраста под воздействием R-209 погибло 66% гусениц, под влиянием R-213 – 33%, а на березе – соединение R-209 вызвало 100%-ную гибель особей, вещество R-213 – 66,6% по сравнению с контролем. Самая низкая интенсивность роста выявлена

у гусениц V возраста под воздействием R-209. Несколько выше данный показатель в варианте с воздействием R-213. Также нами установлено влияние агонистов экдистероидов на снижение качества коконов китайского дубового шелкопряда. Следовательно, данные биологически активные вещества проявляют ярко выраженную инсектицидную активность по отношению к дубовому шелкопряду, которая усугубляется при питании гусениц листом березы бородавчатой. То есть, установленное нами различие химизма листа дуба и березы оказывает сильное влияние на физиологическую реакцию организма дубового шелкопряда по отношению к воздействию ксенобиотиков, какими являются агонисты экдистероидов R-209, R-213.

В серии опытов методом электрофореза в ПААГ нами изучался фракционный состав растворимых белков гемолимфы куколок дубового шелкопряда в зависимости от характера действия агонистов экдистероидов и условий питания. Сравнительные электрофореграммы белков гемолимфы куколок представлены на рис. 10.

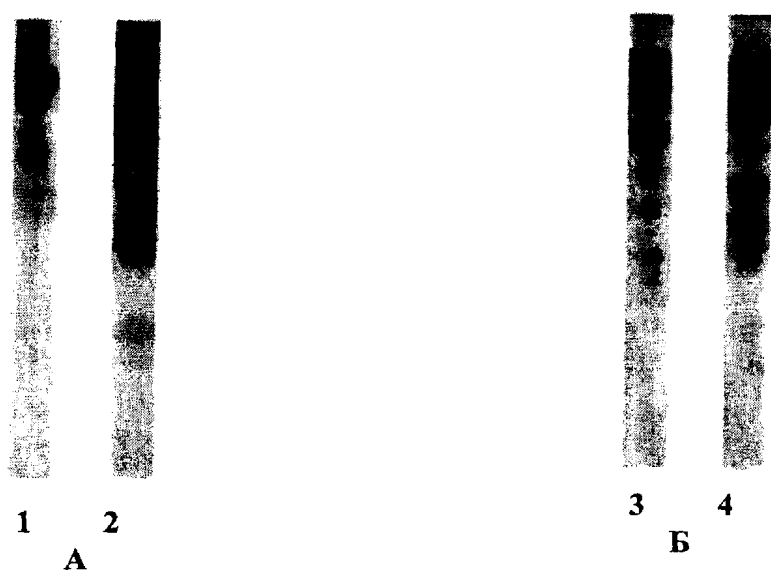


Рис. 10. Электрофоретические спектры растворимых белков гемолимфы куколок дубового шелкопряда: А – береза: 1 – контроль, 2 – опыт R-209; Б – дуб: 3 – контроль, 4 – опыт R-209.

Анализируя результаты электрофоретических исследований (рис. 10, табл. 5), следует указать на достаточно высокую гетерогенность растворимых белков гемолимфы. На электрофореграммах отчетливо удается различить от 13 до 17 фракций, соответствующих индивидуальным белкам. Из данных табл. 5 следует, что в гемолимфе куколок контрольных образцов, выращенных на березе, отсутствуют 2 фракции: 3, 11, по сравнению с куколками, выращенными на дубе, в которых отчетливо просматривается 9 фракций белков.

Таблица 5

Относительная электрофоретическая подвижность (ОЭП) растворимых белков гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда

№ фракции	ОЭП (%)			
	Береза		Дуб	
	Контроль	Опыт R-209	Контроль	Опыт R-209
1	—	—	3,5	3,5
2	5,8	—	—	—
3	—	—	8,2	—
4	14,1	14,1	14,1	14,1
5	21,2	21,2	21,2	21,2
6	2	—	23,5	—
7	3,5	—	30,6	—
8	30,6	35,3	—	35,3
9	—	42,4	—	42,4
10	—	47,0	47,0	47,0
11	47,0	—	53,0	53,0
12	—	64,0	—	64,0
13	—	—	70,6	—
14	70,6	72,9	—	72,9
15	—	—	—	—

Следовательно, различия биохимического состава корма влияют на степень гетерогенности растворимых белков гемолимфы дубового шелкопряда, питание листом березы уменьшает степень гетерогенности белков гемолимфы на 22,3% по сравнению с питанием листом дуба. То различие в числе фракций растворимых белков гемолимфы, которое появляется под воздействием кормового растения – дуб (9 фракций), береза (7 фракций), сохраняется постоянным при обработке листа раствором агониста R-209. У куколок, выращенных на березовых листьях, которые обрабатывались препаратом R-209, наблюдается исчезновение одних белковых фракций (2, 6, 7, 13) и появление других белковых фракций (8, 9, 12, 14) по сравнению с контролем. Препарат R-209 у куколок на дубе также вызвал исчезновение одних (3, 6, 7, 13) и появление других белковых фракций (8, 9, 12, 14), таких же, как и в опыте на березе. Таким образом, влияние агониста экдистероида R-209 на ОЭП растворимых белков гемолимфы куколок дубового шелкопряда заключается в замене почти 60% фракций на новые, но без изменения числа фракций по сравнению с контролем как на дубе, так и на березе. Причем и на дубе и на березе появляются одни и те же фракции (8, 9, 12, 14) и исчезают почти одни и те же фракции (на березе – 2, 6, 7, 13; на дубе – 3, 6, 7, 13). Следовательно, возникшее изменение фракционного состава гемолимфы дубового шелкопряда под воздействием R-209 не корректируется различием кормового субстрата и имеет универсальный характер, хотя кормовой субстрат оказывает существенное влияние на число фракций – 7 на березе, 9 на дубе.

Результаты исследования количественного содержания растворимых белков в гемолимфе куколок, полученных из гусениц, питавшихся обработанным R-209 листом дуба и березы, представлены в табл. 6.

Таблица 6

Изменение содержания растворимых белков в гемолимфе куколок дубового шелкопряда под влиянием R-209, г/л

№	Вариант опыта	Кормовые растения	
		дуб	береза
1	опыт R-209	43,286 ± 0,369	51,838 ± 0,060
2	контроль	35,510 ± 0,374	70,962 ± 0,603

*Примечание: результаты статистически достоверны ($P \leq 0,001$).

Анализ данных, приведенных в табл. 6, показал, что содержание белка в гемолимфе опытных куколок, полученных из гусениц, питавшихся листом дуба, достоверно превышает таковое в контроле на 27,5%. У опытных куколок, питавшихся листом березы, количество белка в гемолимфе достоверно снижается.

Как показано выше (рис. 7, табл. 4), вещество R-209 обладает сильным инсектицидным действием и значительно снижает жизнеспособность и продуктивность дубового шелкопряда, особенно при использовании березы в качестве кормового растения. Поэтому уменьшение числа белковых фракций и содержания белка в гемолимфе опытных куколок также указывает на усиление отрицательного воздействия данного агониста на организм шелкопряда, что согласуется с вышеуказанными данными по смертности, скорости роста и шелкопродукции дубового шелкопряда. В опытных куколках мы также определяли содержание билирубина, глюкозы и триацилглицеролов. Результаты исследований приведены в табл. 7.

Таблица 7

Действие агонистов экидистероидов на метаболиты гемолимфы куколок дубового шелкопряда

Вариант опыта	Дуб черешчатый			Береза повислая		
	BIL (mmol/l)	GLU (mmol/l)	TG (mmol/l)	BIL (mmol/l)	GLU (mmol/l)	TG (mmol/l)
R-209	23,5 ± 2,82	0,667 ± 0,048*	6,86 ± 0	—	—	—
R-213	14,7 ± 3,11	—	6,86 ± 0	23,9 ± 3,51	0,616 ± 0,042	6,86 ± 0
контроль	19,6 ± 2,25	0,562 ± 0,007	4,82 ± 0,25	15,7 ± 5,36	0,631 ± 0,760	6,10 ± 0,12

* Примечание: результаты статистически достоверны ($P \leq 0,001$).

Вещества R-209 и R-213 оказали противоположный эффект на концентрацию билирубина в гемолимфе: на дубе R-209 повысило концентрацию билирубина, а R-213 – снизило по сравнению с контролем. Следовательно, можно предположить, что агонист R-209 обладает признаком токсичности. Данная мысль подтверждается тем, что это вещество повысило концентрацию глюкозы и триацилглицеролов в гемолимфе куколок, полученных из гусениц, питавшихся на дубе. Кормление березой повислой продемонстрировало токсический эффект и у агониста R-213, который также повышает концентрацию билирубина и триацилглицеролов.

Нами исследовалась активность ферментов гемолимфы куколок, полученных из гусениц опытных и контрольных групп. Результаты исследований приведены в табл. 8.

Таблица 8

**Действие агонистов экистероидов, поступивших с кормом,
на активность ферментов в гемолимфе куколок дубового шелкопряда**

Вариант опыта	Дуб черешчатый		Береза повислая	
	GPT (U/l)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)
R-209	14,1 ± 3,6	41,1 ± 3,2	8,6 ± 0,4	5,4 ± 0,2
R-213	36,3 ± 2,5	74,6 ± 3,8	21,9 ± 2,1	74,6 ± 3,5
Контроль	23,3 ± 1,9	67,6 ± 2,7	25,7 ± 1,8	63,3 ± 2,5

Согласно данным табл. 8 вещество R-209 оказало сильное отрицательное влияние на активность аланинаминотрансферазы (GPT) и аспартатаминотрансферазы (GOT). Но на дубе под воздействием R-209 активность GPT снизилась почти на 50% по сравнению с контролем, а активность GOT снизилась на 40% к контролю. На березе соответственно – активность GPT снизилась в 3 раза, а активность GOT – в 10 раз по сравнению с контролем. Следовательно, столь существенное снижение активности ферментов гемолимфы под влиянием агониста R-209, как и повышение концентрации билирубина, указывает на токсичное воздействие данного вещества на организм дубового шелкопряда, которое усиливается при питании листом березы. Согласно нашим данным (табл. 8) агонист R-213 в отличие от агониста R-209 не снизил активность изучаемых ферментов.

Заключение. На основании вышеизложенного можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что к концу вегетации в листьях дуба и березы накапливаются алкалоиды, фенолы и танины, но у дуба этот процесс протекает на более высоком уровне и более быстрыми темпами, чем у березы. Лист всех кормовых растений имеет тенденцию уменьшения концентрации воды, растворимых углеводов, жиров и свободных аминокислот к концу вегетации, но лист березы содержит больше жиров по сравнению с листом дуба, а лист дуба достоверно превышает лист березы по содержанию свободных аминокислот и растворимых сахаров.

2. Дубовый шелкопряд имеет самые лучшие показатели питания и использования усвоенной пищи на рост и развитие именно при питании листом дуба черешчатого (ЭИП – 12,6%, ЭИУ – 32,8%) по сравнению с березой повислой (ЭИП – 10,8%, ЭИУ –

24,9%). Этот результат достигается при меньших затратах листа дуба на создание массы тела гусениц примерно на 16 г/особь, что, возможно, объясняется большей концентрацией первичных метаболитов свободных аминокислот и сахаров в листьях дуба по сравнению с листьями березы.

3. Установлено, что на дубе под воздействием модельного ксенобиотика R-209 погибло 66% гусениц, а на березе вещество R-209 вызвало 100%-ную гибель гусениц. Вещество R-213 на дубе вызвало 33% гибель гусениц, а на березе – 66,6% гибель гусениц по сравнению с контролем. Самая низкая интенсивность роста выявлена у гусениц под воздействием R-209. Несколько выше данный показатель в варианте с воздействием R-213. Следовательно, вещества R-209 и R-213 проявляют ярко выраженную инсектицидную активность по отношению к дубовому шелкопряду, которая усугубляется при питании гусениц листом березы бородавчатой.

4. Уменьшение числа белковых фракций, активности фермента аланинаминотрансферазы и содержания белка и увеличение концентрации билирубина в гемолимфе опытных куколок также указывает на усиление отрицательного воздействия агониста – R-209 на организм шелкопряда при питании листом березы, что согласуется с вышеуказанными данными по смертности, скорости роста и шелкопродукции дубового шелкопряда.

Таким образом, анализ биохимических показателей состояния гемолимфы куколок дубового шелкопряда подтверждает сделанный нами ранее вывод о том, что вещество R-209 обладает более сильным инсектицидным действием, чем R-213, и значительно снижает жизнеспособность дубового шелкопряда, особенно при использовании березы в качестве кормового растения. Следовательно, культуру китайского дубового шелкопряда можно использовать для оценки действия ксенобиотиков на эукариотический организм, а куколки шелкопряда могут являться объектом биологического мониторинга химического загрязнения окружающей среды.

Л и т е р а т у р а

1. Радкевич, В.А. Экология листогрызущих насекомых / В.А. Радкевич. – Минск: Наука и техника, 1980. – 239 с.
2. Денисова, С.И. Теоретические основы разведения китайского дубового шелкопряда в Беларуси / С.И. Денисова. – Минск: УП «Технопринт», 2002. – 234 с.
3. Харборн, Дж. Введение в экологическую биохимию / Дж. Харборн. – М.: Мир, 1985. – 311 с.
4. Гормональная регуляция развития насекомых / ред. М.С. Гиляров, В.И. Тобиас, В.Н. Буров. – Л.: Наука, 1983. – 182 с.
5. Ахрем, А.А. Экдистероиды: химия и биологическая активность / А.А. Ахрем, Н.В. Ковганко. – Минск: Наука и техника, 1989. – 327 с.
6. Smagghe, G. Comparative toxicity and ecdysone receptor affinity of nonsteroidal ecdysone agonists and 20-hydroxyecdysone in *Chironomus tentans* / G. Smagghe, T.S. Dhadialla, M. Lezzi // *Insect Biochem. And Mol. Biol.* – 2002. – V. 32, № 2. – P. 187–192.

7. Kumar V.S., Santhi M., Krishnan M. RH-5992 – an ecdysone agonist on model system of the silkworm *Bombyx mori* // *Indian J. Exp. Biol.* – 2000. – V. 38, № 2. – P. 137–144.
8. Филиппович, Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянов. – М.: Просвещение, 1983. – 318 с.
9. Feeny P. Effect of tannins in the feeding control of larvae *Operophtera brumata* / P. Feeny // *Ecology*. – 1970. – V. 51. – P. 565–581.
10. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. – М.: Высшая школа, 1983. – 175 с.
11. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков. – Л.: Колос, 1972. – 455 с.
12. Шмальгаузен, И.И. // В кн.: Рост животных / И.И. Шмальгаузен. – М. – Л., 1935. – С. 8.
13. Агапова, М.В. К вопросу об активности фенольных и терпеноидных ингибиторов роста у различных по степени морозостойчивости сортов яблони / М.В. Агапова, Г.А. Селянинова, А.Л. Грайфер // Сб.: Рост, развитие и адаптация растений к экстремальным факторам. – Пермь, 1987. – С. 4–13.
14. Babu R., Kumar N. Senthil, Jeyabalan D., Sivaramakrishnan S., Kavitha R., Murugan K. Effect of host plant secondary chemicals on food utilization of *Daphnis nerii* L. (Lepidoptera: Sphingidae) // *Utar Pradesh. J. Zool.* – 1996. – V. 16, № 3. – P. 133–136.
15. Scriber J.M. Limiting effects of low leaf-water content of the nitrogen utilization, energy budget, and larval growth of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera: Saturniidae) // *Oecologia*. – 1977. – V. 28, № 3. – P. 269–287.
16. Шумаков, Е.М. Современные представления о специфике питания насекомых-фитофагов / Е.М. Шумаков, Н.М. Эдельман // *Успехи современной биологии*. – 1979. – Т. 88. – Вып. 2. – С. 277–291.
17. Roberts J.I., Olson B.E. Effect of *Euphorbia esula* on growth and mortality of migratory grasshopper nymphs // *J. Agr. and Urb. Entomol.* – 1999. – V. 16, № 2. – P. 97–106.
18. Ковганко, Н.В. Стероиды: Экологические функции / Н.В. Ковганко, А.А. Ахрем. – Минск: Наука и техника, 1990. – 224 с.
19. Wing K.D. RH-5849, a nonsteroid ecdysone agonists on *Drosophila* all line // *Science*, 1988. – V. 241. – P. 467–469.
20. Karlson P. On the use of ecdisteroid nomenclature XI Ecdysone Workshop: Program Abstracts Ceske Budejovice, 1994. – P. 7–8.
21. Тыщенко, В.П. Основы физиологии насекомых. Ч. 1. Физиология метаболических систем / В.П. Тыщенко. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1976. – С. 30, 219–256.

Поступило 8.10.2007