

На правах рукописи



Ганина Мария Денисовна

**Состав и химическое строение кутикулярных липидов
колорадского жука и стадных саранчовых, их роль в развитии
грибных инфекций насекомых**

1.4.9 – Биоорганическая химия

1.5.4. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском Институте Органической Химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН

Научные руководители:

Морозов Сергей Владимирович, к. х. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский Институт Органической Химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, в. н. с.

Крюков Вадим Юрьевич, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных СО РАН, зав. лаборатории экологической паразитологии

Официальные оппоненты:

Сильников Владимир Николаевич, д. х. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, заведующий лабораторией органического синтеза

Долгих Вячеслав Васильевич, д. б. н., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Защиты Растений, руководитель лаборатории молекулярной защиты растений

Рогожин Евгений Александрович, к. х. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета, к.х.н.

Пестряков П. Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Кутикула насекомых – главный защитный барьер от повреждающих воздействий биотической и абиотической природы. Главной функцией кутикулы является предотвращение обезвоживания. Помимо этого входящие в ее состав компоненты выступают в качестве сигнальных веществ и участвуют во внутри- и межвидовых коммуникациях [Blomquist and Bagnères, 2010], а также определяют восприимчивость к патогенам, проникающим через покровы. Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824) и стадные саранчовые – итальянский прус *Calliptamus italicus* (L., 1758) и перелетная саранча *Locusta migratoria* (L., 1758) – являются экономически значимыми видами, наносящими урон агрокультурам. Энтомопатогенные аскомицеты (родов *Metarhizium* и *Beauveria*) используются в качестве основы препаратов для биологического контроля насекомых. Начальная стадия заражения – взаимодействие грибных конидий и кутикулой хозяина [Pedrini, 2018]. Главными компонентами кутикулы саранчовых и колорадского жука являются углеводороды и жирные кислоты [Nelson et al., 2003, Lockey and Orah, 1990].

Известно, что кутикулярные липиды могут влиять на восприимчивость насекомых к грибным инфекциям [Keyhani, 2018], однако нет целостного понимания их роли в развитии микозов у хозяев. Имеются данные о межвидовых и онтогенетических различиях, а также факторов окружающей среды в устойчивости насекомых к грибным заболеваниям [Bamisile et al., 2021], однако роль кутикулярных компонентов в этих различиях исследована недостаточно. Состав кутикулярных липидов тесно связан с гигротермическими предпочтениями насекомых или их определенными стадиями развития [Lockey and Orah, 1990; Menzel et al., 2017], но компромиссы между адаптациями насекомых к определенным климатическим условиям и восприимчивостью к грибным инфекциям изучены слабо. Исследование указанных взаимодействий и влияние на них состава кутикулярных липидов позволит расширить фундаментальные знания о взаимоотношениях между насекомыми и патогенами и усовершенствовать подходы к биологическому контролю экономически значимых видов.

Объектами исследования в данной работе являлись кутикулярные липиды личинок, куколок, имаго колорадского жука (*L. decemlineata*) и нимф стадных саранчовых (*C. italicus* и *L. migratoria*). Следует отметить, что разные стадии развития колорадского жука характеризуются не одинаковой чувствительностью к энтомопатогенным грибам [Akhanaev et al., 2017]. Указанные представители саранчовых также имеют разные гигротермические преферендумы и разную восприимчивость к грибам [Kryukov et al., 2007].

Цель и задачи исследования.

Цель работы – установление состава и химического строения эпикутикулярных липидов разных фаз развития колорадского жука и двух видов саранчовых с разной восприимчивостью к энтомопатогенным грибам; анализ изменения липидных композиций насекомых при развитии грибных инфекций.

В ходе работы планировалось решить следующие **задачи**:

1. Методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) установить состав и химическое строение эпикутикулярных липидов разных фаз онтогенеза колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* и нимф двух видов саранчовых *Locusta migratoria* и *Calliptamus italicus*;
2. Разработать алгоритм выявления характеристических ионов в масс-спектрах метилразветвленных алканов для их идентификации в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях эпикутикулярных липидов;
3. Провести сравнительный анализ эпикутикулярных липидов личинок, куколок и имаго колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*, а также разных стадий развития личинок внутри IV возраста, различающихся по устойчивости к грибу *Metarhizium robertsii*;
4. Проанализировать изменения липидного состава экстрактов целого тела и кутикулы личинок колорадского жука до и после колонизации грибом *Metarhizium robertsii*;
5. Провести сравнительный анализ эпикутикулярных липидов у нимф перелетной саранчи *Locusta migratoria* и итальянского пруса *Calliptamus italicus*, оценить различия в восприимчивости данных видов к грибам *Metarhizium robertsii* и уровень адгезии конидий к кутикуле;

6. Оценить метрологические характеристики количественного определения углеводов в эпикутикуле насекомых.

Научная новизна полученных результатов.

Впервые методом ГХ/МС установлен состав и химическое строение эпикутикулярных липидов личинок и куколок колорадского жука, а также нимф итальянского пруса. Впервые установлено уменьшение содержания углеводов в эпикутикуле личинок колорадского жука в течение последнего личиночного возраста, что согласуется с уменьшением уровня адгезии конидий *M. robertsii* к кутикуле и снижением восприимчивости к грибу. Впервые показано смещение углеводородного профиля имаго колорадского жука в длинноцепочечную область по сравнению с личинками и куколками, а также увеличение уровня связанных жирных кислот у куколок и свободных ненасыщенных жирных кислот у имаго. Впервые установлено значительное сокращение метилразветвленных углеводов в кутикуле и целом теле колорадского жука после колонизации грибом *M. robertsii*. Впервые показано смещение углеводородного профиля кутикулы у нимф ксерофильного вида *C. italicus* в более длинноцепочечную и разветвленную область по сравнению с мезо-ксерофильным видом *L. migratoria*, а также повышенный уровень адгезии конидий *M. robertsii* к кутикуле *C. italicus* и более высокая восприимчивость этого вида к грибу.

Практическая значимость полученных результатов.

Установленные изменения в липидном составе эпикутикулы и восприимчивости к грибам у разных стадий колорадского жука могут быть использованы для совершенствования подходов к регуляции численности этого вида. С практической точки зрения для регуляции численности колорадского жука будет наиболее эффективным проводить обработку во время преобладания в агросистемах наиболее уязвимых личинок IV возраста, а также использовать препараты, задерживающие развитие личинок, чтобы «продлить» уязвимую стадию. Также для повышения эффективности грибных биопрепаратов целесообразно вводить в питательные среды углеводороды для повышения вирулентности конидий.

Разработанный алгоритм по выявлению характеристических ионов может быть использован для надежной идентификации

веществ в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях близких по строению органических соединений различных классов.

Методология и методы исследования.

Анализ эпикутикулярных липидов насекомых проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) с использованием методик реконструкции хроматограмм по характеристичным ионам. Установление состава и химического строения метилразветвленных углеводов проводили с помощью анализа линейных индексов удерживания, характеристичных ионов в масс-спектрах и с учетом биохимической осуществимости синтеза метилразветвленных углеводов насекомых. В работе использовались личинки, куколки и имаго сибирской популяции колорадского жука и нимфы саранчовых из Юго-Восточного Казахстана. Смывы эпикутикулярного слоя получали по общепринятой методике получения поверхностных липидов членистоногих [Ment et al., 2013]. Инфицирование насекомых грибом *M. robertsii* проводилось перкутантным способом, адаптированным к колорадскому жуку и саранчовым [Kryukov et al., 2022]. Уровень адгезии определяли путем смыва конидий с инфицированных насекомых хлористым метиленом.

Положения, выносимые на защиту.

1. Установленный методом ГХ/МС состав эпикутикулярных липидов личинок, куколок, имаго колорадского жука и нимф двух видов саранчовых представлен предельными нормальными, моно-, ди- и триметилразветвленными углеводородами состава C25-C41, а также свободными и связанными насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами состава C12-C34.

2. Эпикутикулярные метилразветвленные углеводороды имаго колорадского жука образуют 8 изомерно-гомологических рядов углеводов, синтезируемых по определенным биохимическим направлениям, основными из которых являются терминально разветвленные диметилалканы, образующиеся из валина.

3. Композиционный состав углеводов и жирных кислот кутикулы колорадского жука значительно изменяется в процессе онтогенеза. Это согласуется с адаптациями разных стадий

и фаз развития к определенным местообитаниям и обуславливает различную восприимчивость к энтомопатогенным грибам.

4. Энтомопатогенный гриб *M. robertsii* утилизирует метилразветвленные алканы кутикулы и целого тела личинок колорадского жука в процессе микоза. Утилизация грибом алканов повышает уровень вирулентности конидий.

5. Различия в углеводородных профилях кутикулы у нимф двух видов саранчовых (итальянский прус и перелетная саранча) связаны с адаптациями к заселяемым ими биотопам, а также определяют разную аттрактивность кутикулы для конидий энтомопатогенных грибов.

Степень достоверности и апробация результатов.

Основные результаты работы были представлены на международных и всероссийских конференциях: International congress on invertebrate pathology and microbial control (Австралия, 2018), Международная конференция «Биология – наука XXI века», (Пушино, 2020), XI Всероссийская научная конференция и школа «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Новосибирск, 2021), XVI съезд Русского энтомологического общества (Москва, 2022), VII съезд Паразитологического общества (Петрозаводск, 2023). По материалам работы опубликованы 3 научные статьи, входящие в базы Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора.

Основная часть работы была выполнена автором лично, либо с ее непосредственным участием. Эксперименты по патогенезам насекомых выполнены совместно с к.б.н. Тюриным М.В., к.б.н. Носковым Ю.А. и к.б.н. Ярославцевой О.Н. (ИСиЭЖ СО РАН).

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 139 страницах, содержит 58 рисунков, 12 таблиц и 23 приложения. Список литературы содержит 214 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Состав, химическое строение и сравнительный анализ эпикутикулярных липидов колорадского жука на разных стадиях онтогенеза

Установлено, что основными соединениями эпикутикулы личинок являлись моно-, ди- и триметилразветвленные алканы состава C_{28} – C_{32} . Для всех возрастных групп мажорными соединениями являлись углеводороды с длиной цепи C_{30} (рис.1а). Общее содержание углеводов в течение IV возраста уменьшалось более чем в 2 раза: от 24.7 ± 5.5 до 11.6 ± 7.4 мкг на $см^2$ поверхности (рис. 1б). Данный тренд регистрировался для всех индивидуальных соединений (рис. 1а). Содержание свободных жирных кислот ($C16:0$, $C18:2$, $C18:1$, $C18:3$ и $C18:0$) составляло не более 8% от экстракта и не существенно изменялось в течение исследуемого периода.

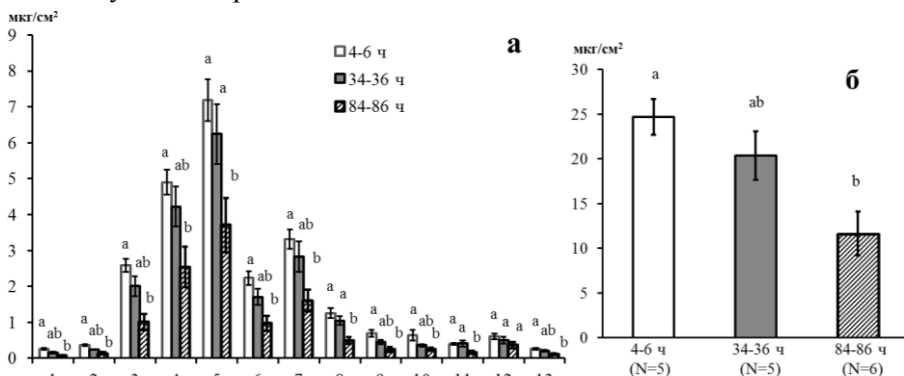


Рис. 1. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание углеводов в эпикутикуле личинок в течение IV возраста. Разные буквы указывают значительные различия между группами (тест Данна, $p < 0.05$). 1 – 2,6-диметилгексакозан, 2 – 10-метилоктакозан, 3 – 2- или 4-метилоктакозан, 4 – 2,10- или 2,18-диметилоктакозан, 5 – 2,6-диметилоктакозан, 6 – 2,10,16- и 2,10,18-триметилоктакозан, 7 – 11-метилноакозан, 8 – 11,17- и 11,19-диметилноакозан, 9 – 12-метилтриаконтан, 10 – 2- или 4-метилтриаконтан, 11 – 2,12- или 2,18-диметилтриаконтан, 12 – 2,6-диметилтриаконтан, 13 – 13-метилгентриаконтан

Показано, что в течение межличиночного периода последнего (IV) возраста у личинок колорадского жука происходят резкие изменения в восприимчивости к грибу *M. robertsii*. Так,

свежеперелинявшие личинки высоко восприимчивы к грибам, тогда как к концу этого периода они становятся более устойчивыми к патогенам (рис.2а). Такая же тенденция наблюдается и для уровня адгезии конидий к кутикуле (рис.2б). Экстракты эпикуткулы существенно стимулировали прорастание конидий гриба *in vitro*, хотя различия между стадиями были несущественными.

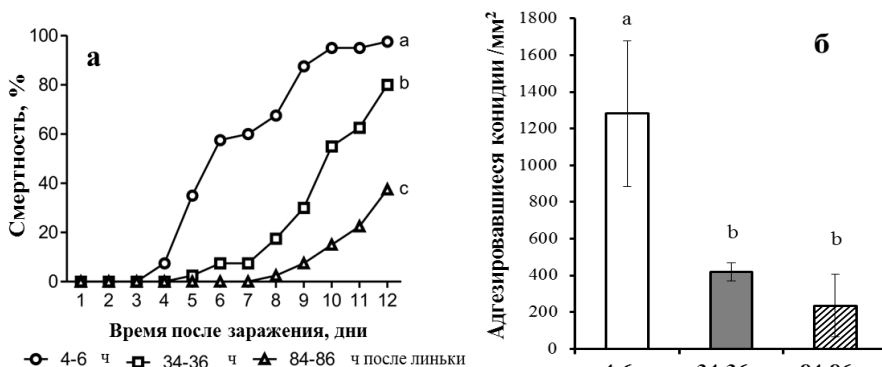


Рис. 2. Динамика смертности личинок колорадского жука, зараженных *M. robertsii*, через 4-6, 34-36 и 84-86 ч после линьки в IV возраст (а), разные буквы указывают значимые отличия (лог-ранк тест, $p < 0.04$); уровень адгезии конидий к кутикуле личинок колорадского жука в течение IV возраста (б); разные буквы указывают значимые отличия между выборками (тест Данна, $p < 0.01$)

Уменьшение содержания углеводов в процессе последнего межлиночного периода, по всей видимости, связано со сменой среды обитания. Свежеперелинявшие личинки обитают на листьях, поэтому имеют риск обезвоживания, но редко инфицируются грибами. В свою очередь более взрослые личинки переходят в почву для формирования предкуколки. В почвенной среде вероятность обезвоживания низка, но высок риск заражения грибными патогенами. То есть предотвращение обезвоживания является фактором опасности для свежеперелинявших личинок, в то время как взрослые личинки должны выработать надежный механизм защиты против почвенных микроорганизмов. Выявленное уменьшение содержания углеводов в кутикуле, по всей видимости, снижает гидрофобность кутикулы и, соответственно, уровень адгезии спор. Можно полагать, что уменьшение общего

количества кутикулярных углеводов в последнем возрасте является одним из адаптивных механизмов защиты личинок от инфицирования грибами при переходе в почву.

Показано, что основными компонентами эпикутикулы всех фаз (личинки, куколки и имаго) являются моно-, ди-, и триметилразветвленные алканы состава C28-C40 (48 соединений). В ряду личинки-куколки-имаго наблюдалось расширение состава углеводов со значительным сдвигом в более длинноцепочечную область (рис.3а), что приводило к четкой кластеризации углеводородных композиций (рис.3б). По степени разветвления мажорной группой во всех фазах были диметилразветвленные алканы.

В эпикутикуле всех фаз колорадского жука идентифицированы свободные и связанные жирные кислоты состава C14-C22 (26 кислот). В эпикутикулярных липидах куколок содержание связанных кислот было более чем в 10 раз выше по сравнению с личинками и имаго ($p < 0.001$, рис.3в,г). Содержание свободных кислот в эпикутикуле куколок и имаго было значительно выше, чем у личинок (рис.3д). При этом, у куколок повышение происходило за счет насыщенных C16:0, C18:0, а у имаго – за счет ненасыщенных C18:1 и C18:2 кислот (рис. 3е). Соотношение насыщенные:ненасыщенные свободные жирные кислоты значительно уменьшалось в процессе развития, составляя 3:1, 4:1 и 1:2 для личинок, куколок и имаго соответственно.

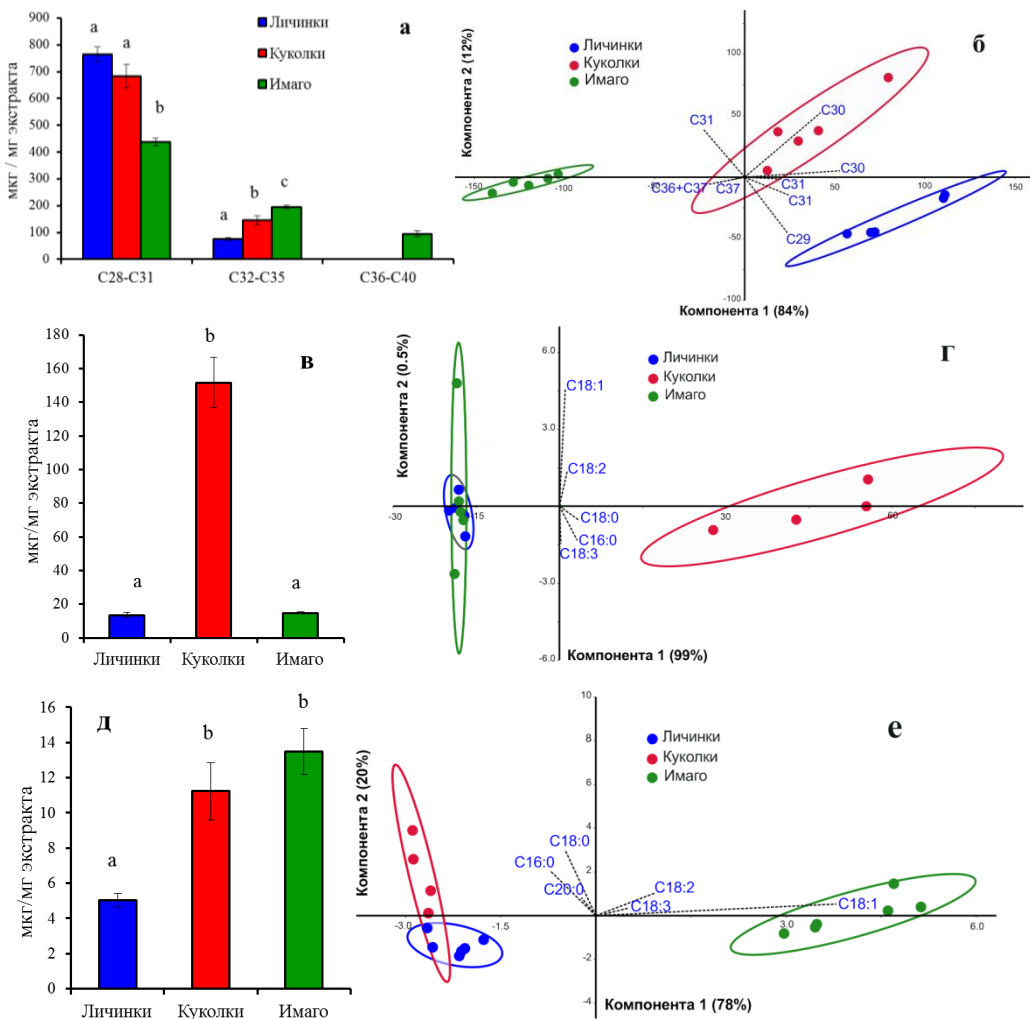


Рис. 3. Динамика содержания кутикулярных липидов у личинок куколок и имаго колорадского жука. Распределение углеводов по общему числу атомов углерода (N=5) (а), суммарное содержание связанных (N=5 для личинок и имаго, N=4 для куколок) (в) и свободных кислот (N=6 для личинок и имаго, N=4 для куколок) (д); анализ главных компонент для углеводов (б), связанных (г) и свободных кислот (е). Разные буквы указывают значимые отличия (тест Тьюки, $p < 0.05$)

Сдвиг углеводородного профиля в более длинноцепочечную область на взрослой стадии, вероятно, связан с большим многообразием сред жизни взрослого жука, а также с вовлечением эпикутикулярных углеводов во внутривидовые коммуникации. Повышение содержания связанных кислот в эпикутикуле на стадии куколки, по-видимому, отражает повышение их уровня в гемоцеле, что служит для запасания энергии при метаморфозе. Ненасыщенные свободные кислоты у имаго вероятно задействованы в синтезе половых феромонов. Подобные изменения в липидных композициях в ряду личинки-куколки-имаго могут вносить вклад в устойчивость к грибным инфекциям. Куколки и имаго значительно более устойчивы к энтомопатогенным грибам *M. robertsii*, в отличие от личинок. Мы предполагаем, что одной из причин этого является большее содержание у куколок и имаго жирных кислот, способных проявлять фунгистатические свойства. Кроме того, устойчивость имаго к патогену может объясняться резким сдвигом кислотного профиля в сторону ненасыщенных жирных кислот, обладающих более выраженными фунгистатическими свойствами по сравнению с насыщенными кислотами.

2. Анализ трансформации состава липидов личинок колорадского жука при микозе

Энтомопатогенные грибы способны метаболизировать углеводороды и жирные кислоты хозяина, однако изменения липидных композиций при микозах в моделях *in vivo* слабо изучены. Были проанализированы изменения липидного состава целого тела и кутикулы (линочных шкур) личинок колорадского жука при их колонизации грибом *M. robertsii*.

В липидах целого тела личинок колорадского жука были обнаружены предельные метилразветвленные углеводороды состава C28-C32, свободные (C12-C20) и связанные (C14-C20) жирные кислоты. После колонизации тела хозяина грибом выявлено существенное снижение всех основных идентифицированных углеводородов (рис. 4а), а их общее содержание уменьшалось в 16 раз по сравнению со здоровыми личинками (рис. 4б). Аналогичный тренд наблюдался при колонизации грибом только кутикулы (линочных шкур) жука.

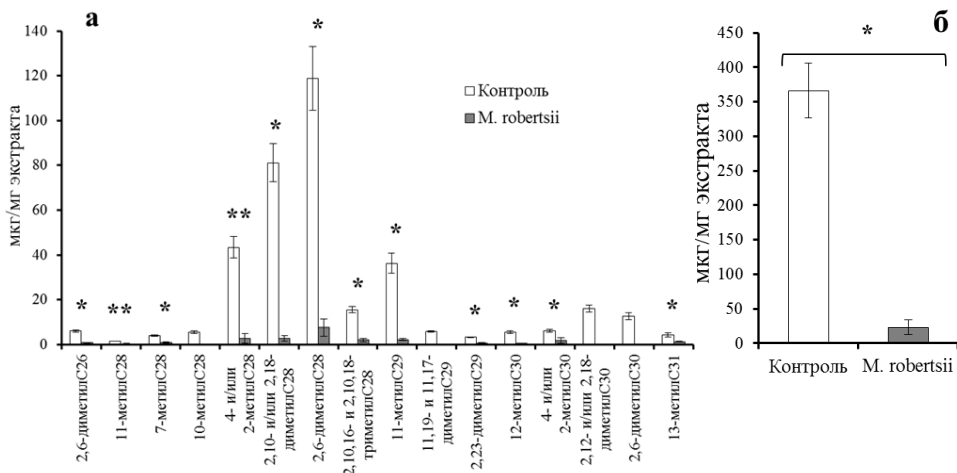


Рис. 4. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание углеводов в экстрактах целого тела личинок колорадского жука до и после колонизации грибом *M. robertsii*. Значимые отличия: *тест Стьюдента, **тест Манна-Уитни, $p < 0.05$, $N=4$

Общее содержание связанных кислот в целом теле не изменялось после колонизации грибом, однако существенно увеличивались содержания C18:2 и C18:1, а уровень C18:3 снижался. Общее содержание свободных кислот в целом теле колонизированных личинок достоверно снижалось в 3.8 раз после колонизации грибом, при этом тренд к уменьшению наблюдался для всех основных кислот (C16:0, C18:2, C18:1, C18:3, C18:0), а наибольшее снижение показано для полиненасыщенных кислот C18:3, C16:3, а также для C20:0.

В экстрактах конидий гриба *M. robertsii*, выращенных на личинках колорадского жука, обнаружены только свободные и связанные жирные кислоты. Это свидетельствует о том, что гриб метаболизировал углеводороды колорадского жука в процессе развития инфекции.

Добавление в питательную среду для культивирования гриба (картофельный агар) эпикутикулярного экстракта колорадского жука привело к последующему повышению вирулентности конидий по отношению к личинкам IV возраста (различия в LT_{50} – одни сутки).

Таким образом, нами впервые показано, что гриб *M. robertsii* утилизирует все метилразветвленные алканы колорадского жука при развитии грибной инфекции. Кроме того, при развитии микоза происходит снижение содержания свободных жирных кислот в теле личинок, что может свидетельствовать об их метаболизации грибом. Питание *M. robertsii* на экстрактах кутикулы колорадского жука с преобладанием углеводов существенно повышает его вирулентные свойства. Эти и ранее полученные данные [Tyurin et al., 2016] свидетельствуют о том, что эпикутикулярные углеводороды способствуют не только адгезии, но и активному росту гриба на/в кутикуле насекомого и быстрому проникновению в полость тела.

3. Состав, химическое строение и сравнительный анализ эпикутикулярных липидов стадных саранчовых с разными гигротермическими предпочтениями

На примере стадных саранчовых показано, как связаны эпикутикулярный липидный состав насекомых с разными биоценотическими и гигротермическими предпочтениями с восприимчивостью к патогенным грибам. В качестве тест-объектов были выбраны нимфы азиатской саранчи *L. migratoria* (мезоксерофил, предпочитающий тростниковые крепи близ водоемов) и итальянского пруса *C. italicus* (ксерофил, населяющий разнообразные станции и предпочитающий полынные степи). Наша гипотеза состояла в том, что кутикула вида, населяющего аридные станции, обладает особой липидной композицией, которая предотвращает обезвоживание, но в то же время делает его более восприимчивыми к патогенам.

Методом ГХ/МС установлено, что основными компонентами эпикутикулярного слоя нимф обоих видов были предельные нормальные, моно-, ди- и триметилразветвленные углеводороды состава C₂₅-C₃₉ (137 соединений), свободные и связанные жирные кислоты состава C₁₄-C₃₄ (16 кислот). Суммарное содержание углеводов существенно не отличалось между исследуемыми видами, однако углеводородные композиции *L. migratoria* и *C. italicus* были разными.

Углеводородный профиль *C. italicus* был значительно сдвинут в более длинноцепочечную область по сравнению с *L. migratoria* (рис. 5а). Профили обоих видов отличались по степени

разветвленности углеводородной цепи (рис. 5б). Содержание монометилалканов у *C. italicus* было в 7.2 раза ниже ($p < 0.0001$), а диметилалканов 1.6 раза выше, чем у азиатской саранчи ($p = 0.002$). Кроме того, у итальянского пруса обнаружены в небольшом количестве триметилалканы, отсутствующие в азиатской саранче.

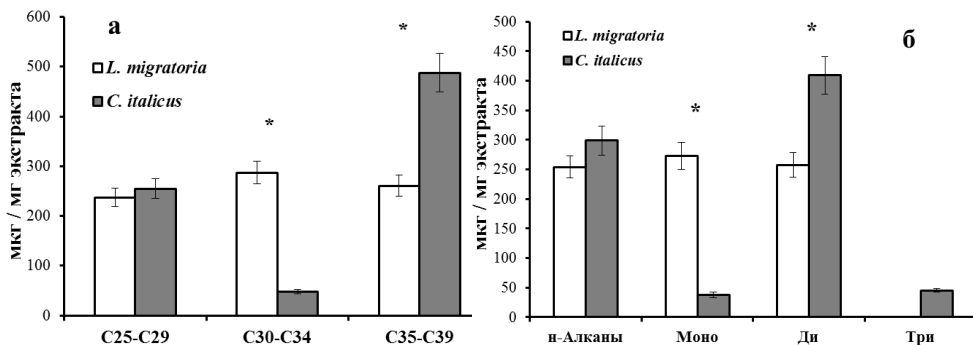


Рис. 5. Состав углеводов в эпикутикуле нимф *C. italicus* и *L. migratoria*: распределение по количеству атомов углерода (а), количеству метильных групп (б). *Значимые отличия между видами (N=6, тест Стьюдента, $p < 0.05$)

Спектр свободных и связанных жирных кислот итальянского пруса был гораздо уже (C16-C20), чем у азиатской саранчи (C14-C34). Доминирующей кислотой у *C. italicus* была C16:0, тогда как у *L. migratoria* преобладали длинноцепочечные кислоты C28:0 и C30:0.

Нами установлено, что *C. italicus* более восприимчив к грибным патогенам *Metarhizium* и *Beauveria*, по сравнению с *L. migratoria*. Так, полужетальное время (LT_{50}) после обработки конидиями *M. robertsii* составило 12 ± 0.06 д для *L. migratoria* и 9 ± 0.06 д для *C. italicus* ($p < 0.0001$, рис. 6а). Количество адгезировавшихся конидий к кутикуле нимф *C. italicus* было в 3.3 раза выше, чем к кутикуле *L. migratoria* (рис. 6б). Оба экстракта саранчовых стимулировали прорастание конидий на агарозе, однако уровни прорастания отличались несущественно.

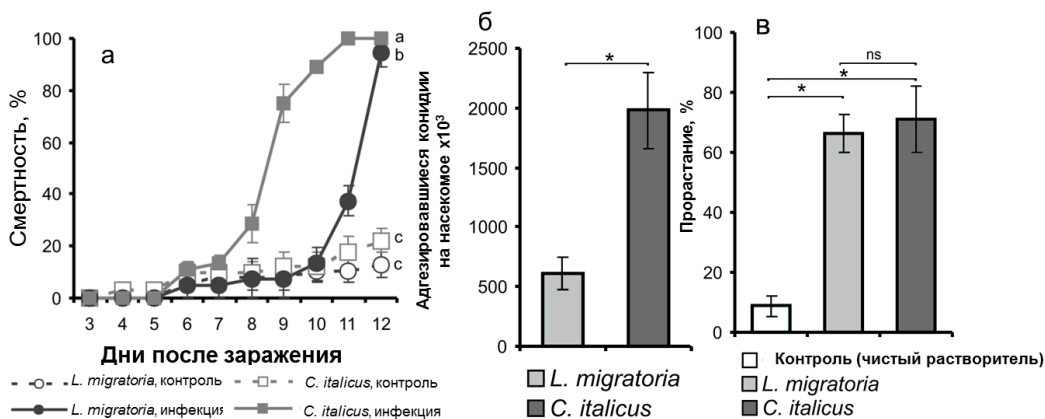


Рис. 6. Динамика смертности нимф *L. migratoria* и *C. italicus*, зараженных *M. robertsii* (а), разные буквы указывают значимые различия в динамике смертности (лог-ранк тест, $p < 0.009$); количество адгезировавшихся конидий *M. robertsii* к кутикуле саранчовых (б) и прорастание конидий на эпикуткулярных экстрактах саранчовых (в). * $p < 0.003$ (тест Стьюдента); ns: незначительные различия

Мы предполагаем, что высокое содержание ди- и триметилалканов у итальянского пруса является адаптацией к аридному климату: метилразветвленные алканы расширяют диапазон плавления эпикуткулы, делают липидную матрицу более текучей, что важно при больших суточных колебаниях температур [Lockey and Oraha, 1990]; длинноцепочечные компоненты предотвращают обезвоживание [Gibbs, 2002]. С другой стороны гидрофобные длинноцепочечные алканы могут вносить вклад в неспецифическую адгезию конидий к кутикуле [Butt et al., 2016]. Отсутствие существенных различий в уровне прорастания конидий на экстрактах свидетельствует о том, что именно изменение уровня адгезии вносит вклад в повышенную восприимчивость *C. italicus* к грибам. Таким образом, кутикула *C. italicus* лучше адаптирована к аридному климату, но в тоже время более аттрактивна для энтомопатогенных грибов.

4. Установление химического строения метилразветвленных алканов в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях эпикуткулярных липидов

Эпикуткула насекомых представляет собой сложную многокомпонентную смесь близких по строению и физико-

химическим свойствам углеводородных изомеров. Это приводит в ряде случаев к недостаточному хроматографическому разделению пиков индивидуальных соединений. Установление химического строения метилразветвленных углеводородов проводилось на основе [Nelson et al., 2003]: сравнения рассчитанных и литературных линейных индексов удерживания; анализа характеристичных ионов в масс-спектрах, образующихся при разрыве углеродной цепи в местах разветвления; данных о биохимической осуществимости синтеза метилразветвленных углеводородов насекомых.

С целью надежной идентификации метилразветвленных углеводородов был разработан алгоритм по выявлению характеристических ионов в масс-спектрах идентифицируемых соединений на основе статистической обработки масс-спектров линейных и метилразветвленных алканов. Из данных масс-спектра *n*-алкана C33 в области с *m/z* от 155 до 407 для интенсивностей ионов строились анаморфоза и регрессия. На основе рассчитанной регрессии строился $\pm 3\sigma$ -интервал. В случае, если интенсивность характеристического иона метилразветвленного алкана превышала верхний предел 3σ -интервала, то ион считался характеристическим, в противном случае – нет. На рис. 7 приведен пример применения данного алгоритма для идентификации 11,21-диметилгептатриаконтана в сложном пике углеводородного профиля эпикутикулы итальянского пруса.

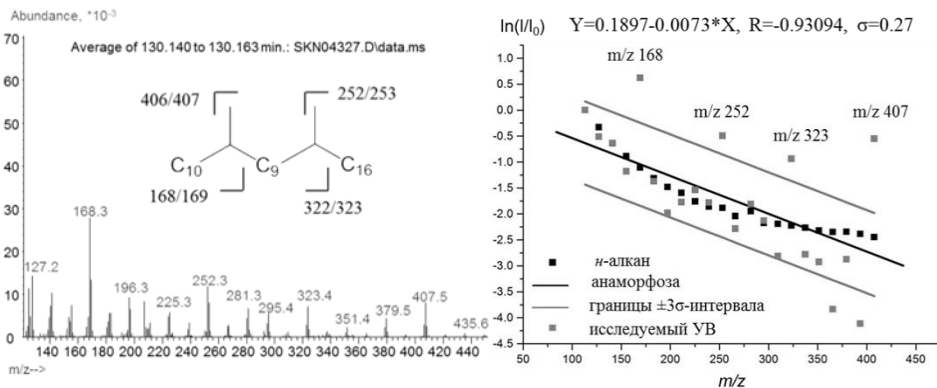


Рис. 7. Масс-спектр сложного пика в углеводородном профиле эпикутикулы итальянского пруса и схема выявления характеристических ионов 11,21-диметилгептатриаконтана

Несмотря на большое разнообразие идентифицированных метилразветвленных углеводородов имаго колорадского жука показано, что все они образуют 8 изомерно-гомологических рядов моно-, ди- и триметилразветвленных алканов с длиной главной цепи C26-C37, синтезируемых по определенным биохимическим направлениям. Основная группа изомерно-гомологических рядов – терминально разветвленные углеводороды с разветвлением во 2-м положении, синтезируемые из валина (51 % кутикулярных липидов) [Blomquist and Bagnères, 2010]. В данной биохимической группе самое высокое содержание наблюдалось для диметилалканов. Второе биохимическое направление – синтез внутренне разветвленных алканов из ацетила-СoА (18%). Изомерно-гомологические ряды углеводородов, синтезируемых из пропионил-СoА, составляют 4%. В табл. 1 приведены биохимические пути синтеза основных групп метилразветвленных углеводородов и их содержание. Примеры изомерно-гомологических рядов ди- и триметилалканов колорадского жука приведены на рис. 8.

Таблица 1. Содержание основных групп метилразветвленных углеводородов в эпикутикуле колорадского жука и биохимические пути их синтеза (% от эпикутикулярных липидов, N=5).

Терминально разветвленные (исходное вещество – валин)	50.7±1.3	Монометил (V1)	11.6±0.2
		Диметил (V2)	28.5±1.0
		Триметил (V3)	10.6±0.5
Внутренне разветвленные (исходное вещество – ацетил-СoА)	17.8±0.7	Монометил (A1)	9.0±0.2
		Диметил (A2)	9.0±0.7
		Триметил (A3)	0.1±0.03
Внутренне разветвленные (исходное вещество – пропионил-СoА)	3.6±0.2	Монометил (P1)	2.7±0.1
		Диметил (P2)	0.9±0.1

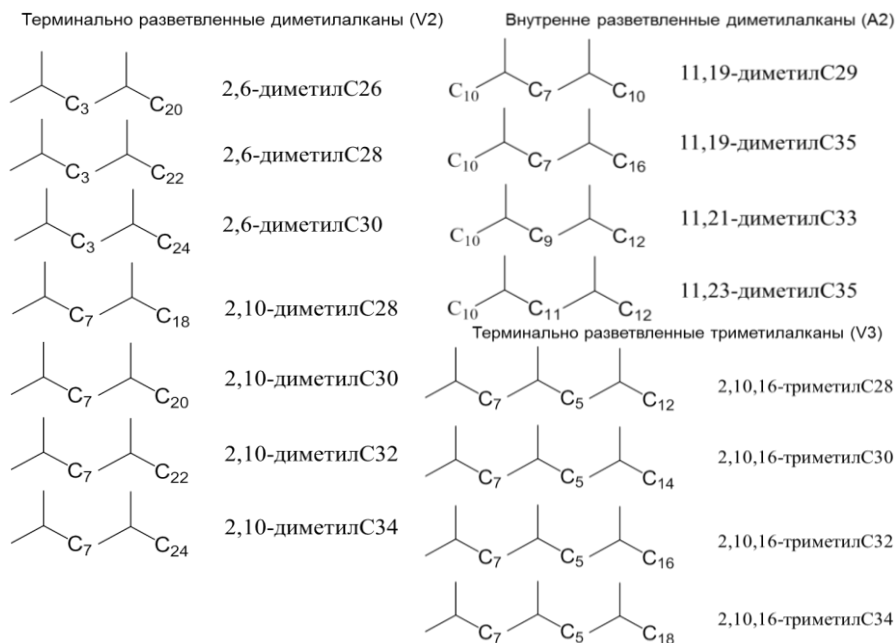


Рис. 8. Изомерно-гомологические ряды ди- и триметилалканов основных биохимических групп

5. Оценка метрологических характеристик количественного определения эпикутикулярных углеводов

Оценены метрологические характеристики количественного определения углеводов в эпикутикулярном слое колорадского жука и саранчовых методом ГХ/МС. Прецизионность оценивали в варианте повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. Показатель повторяемости определяли по эпикутикулярным липидам итальянского пруса; для диапазона концентраций 0.001-0.01 мг/мл показатель повторяемости составил 3.8%, для диапазона 0.01-0.1 мг/мл – 1.7%. На основе данных по повторяемости была оценена погрешность, которая составила для диапазона 0.001-0.01 мг/мл – 7.4%, для диапазона 0.01-0.1 мг/мл – 3.4%. Для определения показателей внутрилабораторной прецизионности использовали образец эпикутикулы личинок колорадского жука; показатель внутрилабораторной прецизионности составил 22.9% для диапазона

0.0001-0.005 мг/мл и 16.1% для диапазона 0.005-0.05 мг/мл. Предел обнаружения, определенный по стандартным растворам *n*-октакозана, составил 0.0001 мг/мл при соотношении сигнал:шум 3:1. Линейный динамический диапазон составил 2 порядка от 0.001 до 0.15 мг/мл. Данные характеристики позволяют достоверно определять содержание углеводов в эпикутикуле насекомых.

Заключение

Полученные методом ГХ/МС данные по составу и химическому строению кутикулярных липидов позволили раскрыть их важную роль в развитии грибных патогенов у насекомых. В частности, наши данные показывают на примере личинок колорадского жука, что метилразветвленные алканы стимулируют адгезию и прорастание конидий гриба *Metarhizium robertsii*. В процессе колонизации гриб метаболизирует метилразветвленные углеводороды колорадского жука, а питание ими усиливает вирулентность патогена. Кроме того, полученные данные расширяют представление о компромиссе функций эпикутикулы и сменой главных факторов опасности на конкретной стадии развития или в определенном местообитании. Так, уменьшение содержания углеводов в эпикутикуле личинок в период завершения питания связано со сменой наземно-воздушной и почвенной сред и соответствующих рисков. Увеличение содержания длинноцепочечных углеводов и изменение жирнокислотного состава эпикутикулы колорадского жука в процессе онтогенеза связано с изменением сред жизни у разных фаз жука, запасанием энергии в процессе метаморфоза и, вероятно, с внутривидовыми коммуникациями. Однако эти же изменения вносят вклад в различную восприимчивость разных фаз развития жука к патогенам. Различия в эпикутикулярном составе саранчовых согласуются с их разными гигротермическими предпочтениями и с разной восприимчивостью к энтомопатогенным грибам. Установленные изменения в липидном составе эпикутикулы и восприимчивости к грибам у разных стадий колорадского жука могут быть использованы для совершенствования подходов к применению энтомопатогенных аскомицетов для регуляции численности вредителей. Работа была поддержана грантами Российского Научного Фонда № 18-74-00085 и 20-74-10043.

Выводы:

1. Методом ГХ/МС выполнено изучение эпикутикулярных липидов личинок, куколок, имаго колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* и нимф двух видов стадных саранчовых *Locusta migratoria* и *Calliptamus italicus*. На основе хромато-масс-спектрометрических данных установлены составы и химические строения нормальных, моно-, ди-, и триметилразветвленных алканов, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот эпикутикулярных липидов.
2. Разработан алгоритм по выявлению характеристических ионов в масс-спектрах метилразветвленных углеводов для их идентификации в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях эпикутикулярных липидов насекомых и показано, что метилразветвленные углеводороды имаго колорадского жука образуют 8 изомерно-гомологических рядов.
3. В течение последнего возраста личинок колорадского жука уменьшается содержание метилразветвленных углеводов в эпикутикуле, что сопровождается падением уровня адгезии конидий *Metarhizium robertsii* к покровам и снижением восприимчивости к грибу.
4. В процессе жизненного цикла у колорадского жука углеводородный профиль эпикутикулы смещается в сторону более длинноцепочечных компонентов, а также увеличивается содержание связанных жирных кислот у куколок, ненасыщенных свободных жирных кислот у имаго.
5. В процессе патогенеза гриб *Metarhizium robertsii* утилизирует все метилразветвленные углеводороды кутикулы и целого тела личинок колорадского жука.
6. Углеводородный профиль эпикутикулы нимф итальянского пруса *Calliptamus italicus* сдвигается в сторону длинноцепочечных и ди- и триметилразветвленных алканов по сравнению с нимфами перелетной саранчи *Locusta migratoria*. При этом у итальянского пруса наблюдается более высокий уровень адгезии конидий *Metarhizium robertsii* к кутикуле и более высокая восприимчивость к грибу, по сравнению с перелетной саранчой.
7. Оценены метрологические характеристики количественного определения углеводов в эпикутикуле насекомых методом

ГХ/МС: показатели прецизионности, предел обнаружения, линейный динамический диапазон и погрешность.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Tomilova O. G., Yaroslavl'tseva O. N., **Ganina M. D.**, Tyurin M. V., Chernyak E. I., Senderskiy I. V., Noskov Yu. A., Polenogova O. V., Akhanaev Yu. B., Kryukov V. Yu., Glupov V. V., Morozov S. V. Changes in antifungal defence systems during the intermoult period in the Colorado potato beetle // Journal of Insect Physiology. – 2019. – V. 116. – P. 106-117. – <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.05.003>
2. **Ganina M.D.**, Tyurin M.V., Zhumatayeva U.T., Lednev G.R., Morozov S.V., Kryukov V.Y. Comparative Analysis of Epicuticular Lipids in Locusta migratoria and Calliptamus italicus: A Possible Role in Susceptibility to Entomopathogenic Fungi // Insects. – 2022. – V. 13. – No. 8. – P. 736. –<https://doi.org/10.3390/insects13080736>
3. **Ganina M. D.**, Tyurin M. V., Kryukov V. Y., Morozov S. V. Patterns in the Formation of Isomeric Homologous Series of Epicuticular Hydrocarbons in Colorado Beetle Leptinotarsa decemlineata // Chemistry of Natural Compounds. – 2023. – V. 59. – No. 6. – P. 1027-1033. – DOI 10.1007/s10600-023-04189-z