

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМЕНИ Н.Н. ВОРОЖЦОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:

к.х.н. Морозов Сергей Владимирович

д.б.н. Крюков Вадим Юрьевич

Новосибирск – 2024

Оглавление

Оглавление	2
Список сокращений	5
Введение	6
Глава 1. Роль эпикутикулярных липидов в физиологии насекомых и развитии грибных болезней (обзор литературы)	12
1.1. Физиологическая роль эпикутикулярных липидов	13
1.1.1. Роль эпикутикулярных липидов в защите от обезвоживания	13
1.1.2. Композиционные изменения липидов у насекомых в процессе развития	18
1.1.3. Биосинтез эпикутикулярных углеводов насекомых	22
1.1.4. Роль кутикулярных углеводов и жирных кислот в развитии микозов у насекомых	26
1.1.5. Значение эпикутикулярных углеводов в коммуникации	32
1.1.6. Состав эпикутикулярных липидов исследуемых видов насекомых и их восприимчивость к энтомопатогенным грибам	34
1.1.6.1. Колорадский жук (<i>L. decemlineata</i>)	34
1.1.6.2. Саранчовые	36
1.2. Метод ГХ/МС для исследования эпикутикулярных липидов насекомых	40
1.2.1. Использование индексов удерживания при анализе кутикулярных углеводов	41
1.2.2. Анализ масс-спектров при идентификации метилразветвленных углеводов	43
1.2.3. Биохимически осуществимые пути синтеза метилразветвленных углеводов насекомых	47
1.3. Заключение по литературному обзору	49
Глава 2. Материалы и методы	50
2.1. Реактивы и материалы	50
2.2. Насекомые	50
2.3. Восприимчивость к грибной инфекции <i>M. robertsii</i>	51
2.4. Уровень адгезии и прорастания <i>M. robertsii</i>	52
2.5. Заражение личинок колорадского жука для анализа липидного состава насекомых до и после колонизации грибом	53
2.6. Влияние кутикулярных липидов колорадского жука на вирулентность гриба <i>M. robertsii</i>	53
2.7. Получение образцов кутикулярных липидов	54
2.8. Дериватизация смывов и экстрактов кутикулярных липидов	56

2.9. ГХ/МС анализ	57
2.10. Оценка метрологических характеристик	59
2.11. Статистическая обработка	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	61
3.1. Состав, химическое строение и сравнительный анализ эпикутикулярных липидов колорадского жука на разных стадиях онтогенеза	61
3.1.1. Состав, химическое строение и сравнительный анализ эпикутикулярных липидов у личинок в течение IV возраста.....	61
3.1.2. Состав, химическое строение и сравнительный анализ эпикутикулярных липидов у личинок, куколок и имаго колорадского жука	66
3.1.2.1. Углеводороды	67
3.1.2.2. Жирные кислоты	72
3.2. Анализ трансформации состава липидов личинок колорадского жука при микозе	77
3.2.1. Липиды целого тела насекомых	77
3.2.2. Липиды конидий гриба <i>M. robertsii</i>	79
3.2.3. Изменение состава липидов личинок колорадского жука после обработки конидиями грибов	79
3.2.4. Вирулентность гриба <i>M. robertsii</i>	81
3.3. Состав, химическое строение и сравнительный анализ эпикутикулярных липидов стадных саранчовых с разными гигротермическими предпочтениями	84
3.3.1. Кутикулярные липиды	85
3.3.1.1. Углеводороды	85
3.3.1.2. Жирные кислоты	89
3.3.1.3. Кетоны	89
3.3.2. Восприимчивость саранчовых к <i>M. robertsii</i>	90
3.3.3. Адгезия и прорастание конидий <i>M. robertsii</i>	90
3.4. Установление химического строения метилразветвленных алканов в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях эпикутикулярных липидов	95
3.4.1. Анализ пиков из хроматографических профилей эпикутикулярных липидов	96
3.4.2. Анализ сложных пиков из хроматографических профилей эпикутикулярных липидов.....	96
3.4.3. Разработка алгоритма по выявлению характеристических ионов в масс-спектрах метилразветвленных алканов для их идентификации в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях эпикутикулярных липидов	101

3.4.4. Изомерно-гомологические ряды эпикутикулярных углеводов имаго колорадского жука	104
3.5. Оценка метрологических характеристик количественного определения эпикутикулярных углеводов	111
Заключение	115
Выводы	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	140

Список сокращений

ГХ/МС – газовая хроматография масс-спектрометрия

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК – индекс Ковача

ИПС – искусственная питательная среда

ИУ – индекс удерживания

ЛИУ – линейный индекс удерживания

СКО – среднее квадратичное отклонение

АСР – ацилпереносающий белок

АМР – аденозинмонофосфат

АТР – аденозинтрифосфат

СоА – кофермент А

СРВА – хлорнадбензойная кислота

СYP4G – цитохром P450

DCM – дихлорметан

FAD/FADH₂ – флавинадениндинуклеотид

LT₅₀ – полумлетальное время

NADP⁺/NADPH – никотинамиддинуклеотидфосфат

SCAN – хроматографирование в режиме полного ионного тока

SIM – хроматографирование в режиме селективного детектирования индивидуальных ионов

ВВЕДЕНИЕ

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 [1,2], а также определяют восприимчивость к патогенам, проникающим через покровы (грибы, нематоды, паразитоиды). 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, способными наносить урон агрокультурам и обладающими устойчивостью к ряду химических инсектицидов. Энтомопатогенные аскомицеты родов *Metarhizium* и *Beauveria* – естественные регуляторы численности указанных видов. Кроме того, они используются в качестве основы препаратов для биологического контроля насекомых [3]. На начальной стадии заражения происходят сложные взаимодействия между грибными конидиями и кутикулой хозяина [4,5]. С точки зрения химического состава главными компонентами кутикулы саранчовых и колорадского жука являются углеводороды и жирные кислоты [6-8].

Известно, что кутикулярные углеводороды и жирные кислоты могут влиять на восприимчивость насекомых к грибным инфекциям [9,10], однако нет целостного понимания их роли в развитии микозов у хозяев. С экологической точки зрения имеются данные о межвидовых различиях, роли иммунных и онтогенетических изменений, а также факторов окружающей среды в устойчивости насекомых к грибным заболеваниям [11,12], однако роль кутикулярных компонентов в этих различиях исследована недостаточно. Известно, что данные липиды определяют гидрофобность кутикулы и, соответственно, могут влиять на степень адгезии грибных пропагул к покровам хозяина на начальных стадиях микоза [13]. В то же время ряд кутикулярных липидов ингибируют или наоборот стимулируют процессы прорастания конидий и проникновения гифальных тел через покровы в гемоцель насекомого [4,5,14,15]. Состав кутикулярных липидов тесно связан с гигротермическими предпочтениями насекомых или их определенными стадиями развития [8,16], но компромиссы между адаптациями насекомых к определенными 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 [17]. Указанные представители саранчовых также имеют разные биоценотические и гигротермические предпочтения [18,19] и разную восприимчивость к грибам [20].

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. Выявлены изменения в липидном составе эпикутикулы колорадского жука на разных стадиях развития, сопровождающиеся изменением восприимчивости к грибным патогенам. В частности 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*, свидетельствующее об утилизации грибом этих соединений. Впервые показано смещение углеводородного профиля кутикулы у нимф ксерофильного вида саранчовых *C. italicus* в более длинноцепочечную и разветвленную область, по сравнению с мезо-ксерофильным видом *L. migratoria*. Последнее согласуется с повышенным уровнем адгезии конидий *M. robertsii* к кутикуле *C. italicus* и более высокой восприимчивостью этого вида к грибу. Полученные результаты расширяют знания о составе эпикутикулярных липидах насекомых, представления об адаптационных механизмах насекомых к различным биотическим и абиотическим факторам среды и компромиссе функций эпикутикулы между обезвоживанием и устойчивостью к патогенам.

Практическая значимость полученных результатов.

Полученные данные по составу и химическому строению кутикулярных липидов насекомых позволяют объяснить различный уровень восприимчивости к патогенным грибам у саранчовых с разными гигротермическими предпочтениями. 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 этого вида. С практической точки зрения для регуляции численности колорадского жука будет наиболее эффективным проводить обработку во время преобладания в агросистемах личинок IV возраста, то есть во время их наибольшей уязвимости. Помимо этого полученные данные показывают возможность использования в грибных препаратах компонентов, задерживающих развитие личинок, чтобы «продлить» уязвимую стадию. Повышение вирулентности конидий *M. robertsii* после введения в питательную среду липидов насекомых дает возможности усовершенствования эффективности биопрепаратов на основе энтомопатогенных грибов.

Разработанный алгоритм по выявлению характеристических ионов может быть использован для надежной идентификации веществ в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях изомерных и близких по строению органических соединений различных классов природного, антропогенного и синтетического происхождения. Полученные метрологические характеристики позволяют достоверно определять содержание углеводов в эпикутикулярных липидах насекомых.

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 [6]. 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, предложенной Мент и соавторами [21]. Инфицирование насекомых грибом *M. robertsii* проводилось перкутаным способом, адаптированным к колорадскому жуку и саранчовым [22,23]. Уровень адгезии определяли путем смыва конидий с инфицированных насекомых хлоритым метиленом [24]. Статистический анализ выживаемости проводили с использованием лог-ранк теста. Остальные данные проверяли на нормальность распределения (тест Шапиро-Уилка) и, в зависимости от распределения, использовали при парных сравнениях тесты Стьюдента либо Манна-Уитни, а при множественных сравнениях тест Тьюки либо тест Данна. Статистическая обработка содержания основных компонентов липидов насекомых, а также статистическая обработка данных по метрологическим характеристикам проводилась с использованием программного обеспечения Excel 2010. Статистическая обработка масс-спектров метилразветвленных углеводов для выявления характеристичных ионов была проведена с использованием программного обеспечения Origin 5.0. Анализ выживаемости, попарные и множественные сравнения, анализ главных компонент проводились в программах PAST 3.0 и SigmaStat 3.1.

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 углеводородов, 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. Энтмопатогенный 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 энтмопатогенных 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:

1. Tomilova O. G., Yaroslavtseva 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

Личный вклад автора.

Основная часть работы была выполнена автором лично. Получение липидных экстрактов личинок колорадского жука в экспериментах с грибной колонизацией, разделение свободных и связанных кислот, дериватизация смывов и экстрактов насекомых, химический анализ эпикутикулярных липидов методом ГХ/МС, установление состава и химического строения эпикутикулярных липидов, разработка алгоритма по выявлению характеристических ионов и оценка метрологических характеристик выполнены лично автором. Эксперименты по патогенезам насекомых и получению кутикулярных смывов колорадского жука и саранчовых

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). Автор принимала участие в полевых работах на базе Карасукского стационара ИСиЭЖ СО РАН и Казахского научно-исследовательского института защиты и карантина растений им. Ж. Жиенбаева (г. Алматы). Автор выражает благодарность сотрудникам Группы экологических исследований и хроматографического анализа НИОХ СО РАН: к.х.н. Черняк Е. И., к.х.н. Ткачевой Н. И., Лопаткову А. Ю., Пчельниковой Т. Г. за помощь в проведении исследований, а также сотрудникам Казахского НИИ защиты и карантина растений (г. Алматы): Баймагамбетову Е.Ж., Макарову Е.М., Успанову А., Рвайдаровой Г. Работа была поддержана грантами Российского Научного Фонда № 18-74-00085 и 20-74-10043.

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.

Глава 1. Роль эпикутикулярных липидов в физиологии насекомых и развитии грибных болезней (обзор литературы)

Кутикула является внешним неклеточным сложным слоем, покрывающим все тело насекомого. Она служит первым защитным барьером на пути действия факторов окружающей среды [25]. Кутикула состоит из двух основных слоев: верхнего – эпикутикулы и нижнего – прокутикулы. Прокутикула определяет механические свойства кутикулы, выполняя роль экзоскелета. Она состоит из хитина и белков. Внешний слой – эпикутикула – состоит из липидов и фенол-связывающих белков и сверху покрыт липидным (восковым) слоем [25,26] (рис. 1.1). По химическому составу липиды эпикутикулы включают углеводороды (линейные и/или разветвленные, насыщенные, ненасыщенные), жирные кислоты, триглицериды. Помимо этого в эпикутикуле могут содержаться спирты, альдегиды, воска, фосфолипиды [1].

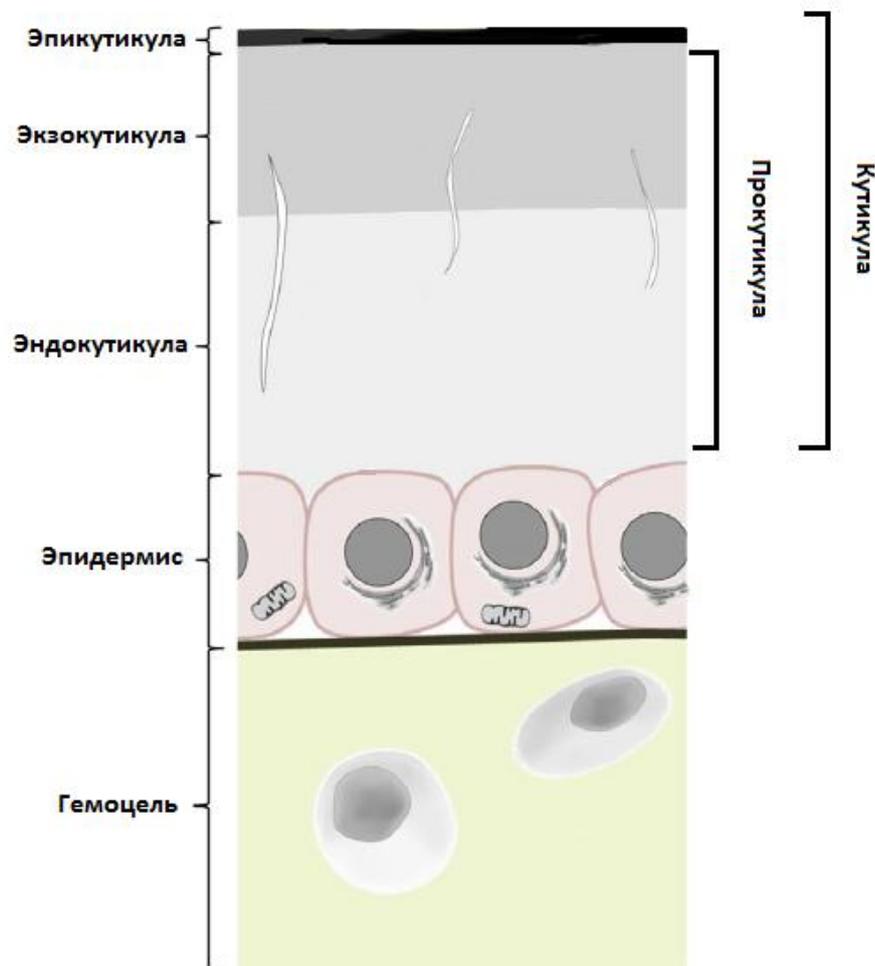


Рис. 1.1. Строение покровов насекомых [13]

Главная функция гидрофобной эпикутикулы – предотвращение обезвоживания. Кроме того, поверхностные липиды участвуют в химической коммуникации, регулируя внутри- и межвидовые отношения [1]. Эпикутикула также является местом проникновения энтомопатогенных грибов, и компоненты эпикутикулярного слоя могут стимулировать или

наоборот ингибировать развитие грибных пропагул [4,5]. Композиция эпикутикулярных липидов может меняться в процессе онтогенеза, отражая появление половых коммуникаций или смену сред обитания. Липидный состав отражает баланс главных функций эпикутикулы – предотвращение обезвоживания и участие в коммуникациях [16].

Колорадский жук и саранчовые являются опасными сельскохозяйственными вредителями. Одним из перспективных способов контроля численности насекомых-вредителей является использование энтомопатогенных грибов [27,28]. Для понимания фундаментальных химических механизмов взаимоотношений насекомого с окружающей средой и для разработки биологических методов борьбы с насекомыми-вредителями важно изучать состав эпикутикулы и как он меняется под воздействием разных биотических и абиотических факторов.

Метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ/МС) является основным методом для анализа кутикулярных липидов насекомых. Углеводороды эпикутикулярного слоя представляют собой сложную многокомпонентную смесь близких по строению и физико-химическим свойствам изомеров. Анализ индексов удерживания, характеристичных ионов, путей биосинтеза, а также методы анализа хроматографических профилей позволяют надежно определить состав, химическое строение и количественное содержание главных компонентов эпикутикулярного слоя насекомых.

1.1. Физиологическая роль эпикутикулярных липидов

1.1.1. Роль эпикутикулярных липидов в защите от обезвоживания

Эпикутикулярные липиды выполняют множество физиологически значимых функций в жизни насекомых. Однако основная и исторически первая идентифицированная функция – это предотвращение испарения с поверхности тела. Насекомые и другие наземные членистоногие за счет малого объема имеют довольно большое соотношение площади поверхности к объему тела, и поэтому проблема обезвоживания стоит весьма остро. Скорость испарения зависит от температуры [29,30]: при умеренных температурах скорость невысока, но резко увеличивается при определенной температуре, которую называют критической (T_C) [1]. И в 1935 году было предложено простое объяснение данному явлению [31]. При физиологических температурах кутикулярные липиды находятся преимущественно в твердом состоянии, что обеспечивает надежный барьер от испарения. При увеличении температуры липиды начинают плавиться/размягчаться, что приводит к повышению проницаемости кутикулы и резкому увеличению испарения.

Состав кутикулы сильно влияет на свойства и температуру плавления кутикулярных липидов. Углеводороды, как и другие липидные соединения, демонстрируют схожую взаимосвязь структуры и $T_{пл}$: наиболее высокую температуру плавления имеют линейные насыщенные углеводороды, при этом $T_{пл}$ возрастает на 1-3°C при увеличении длины цепи на

один атом углерода. Вставка двойной связи, метильной группы или сложно-эфирной группы понижает $T_{пл}$ на 20-50°C в зависимости от их расположения [32,33] (рис. 1.2).

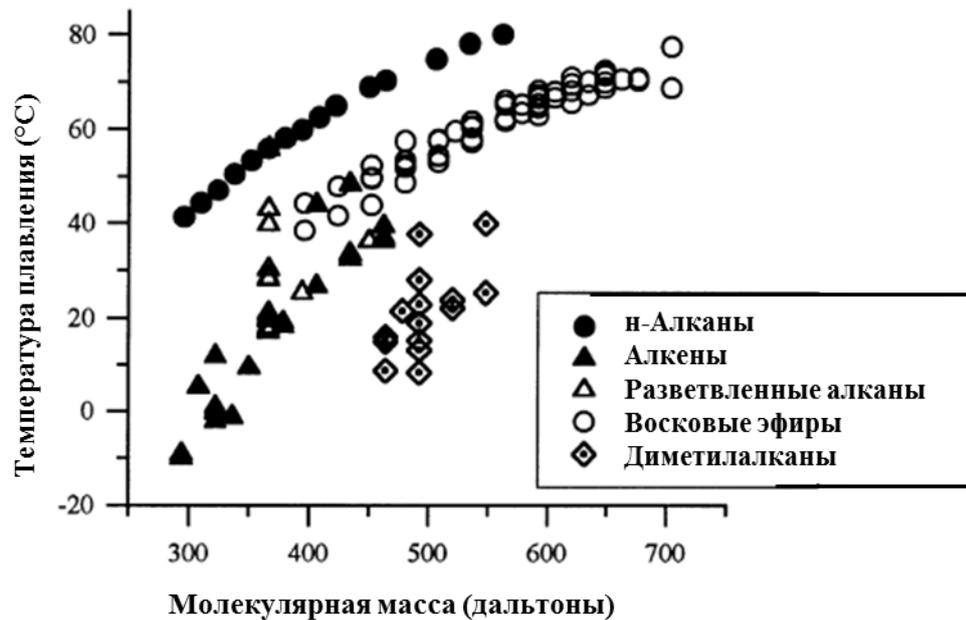


Рис. 1.2. Эффект структурных различий на точке плавления чистых синтетических углеводородов и восковых эфиров [32,33]

Показано, что в ряду углеводородов температура плавления/размягчения уменьшается в следующем порядке: *n*-алканы, монометилалканы, диметилалканы, алкены, алкадиены. При этом молекулярный вес оказывает меньший эффект на точку плавления по сравнению со структурными изменениями [32,34]. Кутикулярные липиды представляют собой сложную многокомпонентную смесь, и размягчение/плавление происходит в определенном диапазоне температур [32]. Липидные композиции эпикутикулы могут варьироваться на разных частях тела насекомого, и значения температуры плавления могут отличаться более чем на 30°C между разными частями одной особи [35,36].

Также испарение воды может зависеть и от вязкости кутикулярного слоя. Так, были измерены значения вязкости экстрактов кутикулярных липидов муравьев *Myrmica rubra* при разной температуре [37]. У муравьев, адаптированных к повышенной температуре (28°C), вязкость кутикулярных липидов была в 70 раз выше, чем у муравьев, адаптированных к 12°C. Различия в вязкости коррелировали и с изменением в составе эпикутикулы. Повышение температуры экспериментальной среды обитания вызывало увеличение уровня *n*-алканов и снижение уровня диметилалканов [37].

С молекулярной точки зрения *n*-алканы формируют плотную кристаллическую упаковку, что обеспечивает надежный барьер от потери воды. Добавление метильной группы в середину цепи нарушает упорядоченность упаковки и приводит к повышению проницаемости [38,39]. Насыщенные углеводороды — *n*-алканы и метилразветвленные компоненты со-

кристаллизуются вместе. Но ненасыщенные углеводороды не образуют смешанный кристалл с алканами [35,40]. Предполагается, что эпикутикула может одновременно содержать более проницаемые области расплавленной фазы алкенов и/или метилразветвленных алканов (выполняющих сигнальную функцию), ниже которых располагается менее проницаемая твердая фаза *n*-алканов [32]. Предполагается, что между двумя точками плавления *n*-алканы существуют в виде твердых вкраплений в жидкой среде алкенов [41].

Кроме того существует еще одно объяснение резкого увеличения скорости кутикулярного испарения при повышении температуры, основанное на термодинамике процесса кутикулярного испарения [42]. В расплавленном эпикутикулярном слое выше энтропия по сравнению с твердым, плотно упакованным липидным слоем. Так что переход воды через расплавленный липидный слой термодинамически более выгоден. В расплавленных липидах, вероятно, повышается транспортная емкость за счет увеличения количества дефектов в липидной упаковке, куда проникает вода. Фактически, растворимость воды в расплавленном слое выше, чем в твердом. Повышенное количество воды в липидном слое и приводит к увеличению скорости испарения через кутикулу [42].

Во многих работах показано, как композиция кутикулярных углеводородов связана с климатическими условиями, в которых обитают разные виды насекомых. При этом, на липидный состав могут влиять как таксономическая принадлежность, так и факторы окружающей среды [43,44]. Так, на примере разных видов муравьев из родов *Crematogaster* (Formicidae: Myrmicinae) и *Camponotus* (Formicidae: Formicinae) из разных биогеографических зон земного шара показано, что композиция кутикулярных липидов зависит от количества осадков ареалов обитания муравьев [16]. Виды, населяющие более влажные регионы, характеризовались уменьшенным содержанием диметилалканов, но увеличенным содержанием алкенов. Уровень *n*-алканов незначительно увеличивался с повышением температуры. При этом средняя длина углеродной цепи не зависела от условий местообитания.

Показаны различия в кутикулярных композициях и для разных видов тигровых жуков из разных микроареалов обитания [45]. У вида, обитающего во влажных участках по берегам рек (*Cicindela oregona*), регистрировалось одинаковое содержание насыщенных и ненасыщенных углеводородов. У вида *C. obsoleta*, предпочитающего жаркие и сухие пастбища, в кутикулярном профиле присутствовали только насыщенные компоненты – метилразветвленные и *n*-алканы (при этом разветвленных в 1.5 раза больше, чем *n*-алканов). К тому же, у *C. obsoleta* авторы выявили больший уровень длинноцепочечных углеводородов и повышенное в 1.5 раза суммарное количество углеводородов на площадь поверхности (см²) по сравнению с *C. oregona*. Показано, что ксерофильный *C. obsoleta* терял воду в 2 раза меньше, чем *C. oregona*. Тенденция по сдвигу молекулярных весов наблюдалась для видов плодовой мухи *Drosophila*: у *D.*

mojavensis, распространенных в пустыне Сонора, в поверхностных липидах преобладают углеводороды C29–C39, в то время как кутикулярные липиды *D. melanogaster* и других мезофильных видов в основном состоят из соединений с менее чем 30 атомами углерода [46].

Для имаго жуков *Tenebrionid* из трех климатических зон пустыни Намиб показано, что абсолютное количество поверхностных липидов жуков увеличивается по мере продвижения в более жаркую и сухую область, хотя композиционный состав углеводородов менялся незначительно [47]. Для популяции саранчи *Melanoplus sanguinipes* из более южных широт в Северной Америке показано, что кутикулярные липиды имеют более высокую точку плавления, хотя химический анализ в данной работе не проводился [48,49].

Локи и Ораха [8] проводили сравнительный анализ кутикулярных липидов имаго перелетной саранчи *L. migratoria migratorioides* и более ксерофильного вида пустынной саранчи *Schistocerca gregaria*. В целом, спектр идентифицированных углеводородов *S. gregaria* был беднее, чем у *L. migratoria*, но по диапазону молекулярных весов спектры в двух видах были примерно одинаковые. Содержание *n*-алканов у *S. gregaria* было выше, а содержание монометилалканов (в частности 3-метилалканов) было ниже по сравнению с *L. migratoria*. Содержание диметилалканов не отличалось значительно у двух видов. Но у *S. gregaria* были идентифицированы триметилалканы (1.5%), которые отсутствовали в *L. migratoria*. Авторы считают, что повышенное содержание *n*-алканов у *S. gregaria* является адаптацией к более аридному пустынному климату, а ди- и триметилалканы в эпикутикуле *S. gregaria* расширяют диапазон плавления смеси углеводородов, что обеспечивает постоянство липидной матрицы в условиях больших колебаний температур в течение суток в аридном климате.

При вышеописанных трендах есть работы, где наблюдаются противоположные тенденции. Например, при исследовании кутикулярных липидов эндемичных видов *Drosophila*, обитающих в Австралии и имеющих разные гигротермические предпочтения [50]: *D. serrata* обитает на окраинах тропических лесов, а *D. birchii* – только во влажных лесах. К тому же *D. serrata* значительно более устойчива к обезвоживанию, чем *D. birchii* [51]. В эпикутикуле *D. birchii* обнаружены *n*-алканы, *n*-алкены и в небольших количествах гомологическая серия алкадиенов; в то время как у *D. serrata* доминируют (Z,Z)-5,9-диены, а также присутствуют алкены и 2-метилалканы, но отсутствуют *n*-алканы [50]. Согласно вышеописанной теории [31], кутикулярный слой *D. birchii* должен создавать более надежную защиту от испарения за счет наличия *n*-алканов, а у *D. serrata* преобладают алкадиены – соединения с более низкой температурой плавления, и теоретически она должна быть более восприимчивым видом к испарению. Вероятно, здесь задействованы другие механизмы в защите от обезвоживания.

Помимо углеводородов важную роль в защите от обезвоживания могут играть жирные кислоты. Локи и Ораха [8] предлагают, что свободные жирные кислоты располагаются на

границе поверхности кутикулы и липидного слоя, закрепляя неполярные липиды на полярной кутикуле. При рассмотрении роли структурных особенностей разных кислот в предотвращении обезвоживания наблюдаются схожие закономерности, что и для углеводов в плане степени ненасыщенности и разветвленности.

Менцель и соавторы [16] высказывают мысль, что композиционный состав углеводов должен отражать баланс функций эпикутикулы. С одной стороны, эпикутикула должна быть достаточно вязкой, чтобы защищать насекомое от обезвоживания. Это свойство определяется содержанием *n*-алканов и/или средней длиной цепи углеводородного профиля. Но с другой стороны эпикутикула должна обладать достаточной текучестью для эффективной коммуникации, а также для равномерного обволакивания поверхности тела насекомых и равномерного распределения полярных компонентов. Это качество определяется содержанием соединений с нарушающими упаковку группами (*n*-алкены, алкадиены и метилразветвленные алканы). Этой же точки зрения придерживаются Локи и Ораха [8] и Гиббс [35]. Текучесть эпикутикулярного слоя также важна для прикрепления насекомого к твердым поверхностям [41]. Чан и Кэрролл [52] считают, что *n*-алканы вряд ли могут участвовать в химической коммуникации из-за их низкого структурного разнообразия, а углеводороды, задействованные в химической коммуникации, гораздо более разнообразны и обладают большим потенциалом для информационной емкости, но из-за низкой точки плавления у них слабый потенциал предотвращения обезвоживания. Однако углеводороды с промежуточной температурой плавления – алкены и метилразветвленные алканы – обладают «двойными характеристиками» (dual traits), то есть могут влиять как на устойчивость к обезвоживанию, так и на химическую коммуникацию (рис. 1.3). Также в [16] высказывается мысль, что совместное присутствие разных типов структур, по-видимому, не случайно, если они происходят из одних или разных биосинтетических путей, но, возможно, есть ограничения на одновременную выработку разных типов веществ. Бломкист и Гинзель [2] считают, что, по всей видимости, существует эволюционный компромисс между противоположными давлениями отбора, наложенными функцией защиты от потери воды кутикулярных углеводов и их ролью в химической коммуникации при данной температуре. Чан и Кэрролл [52] утверждают, что из-за того, что кутикулярные липиды насекомых синтезируются по общим биохимическим путям с использованием ацетил-СоА, возможно, что изменения в синтезе одного типа кутикулярных углеводов ведет к изменению в синтезе других углеводов, которые участвуют в химической коммуникации или защите от обезвоживания. При такой ситуации изменение в направлении синтеза одних кутикулярных углеводов может иметь эффект на другие кутикулярные углеводороды или типы углеводов, но также может оказывать такой же биологический эффект на «двойные характеристики».

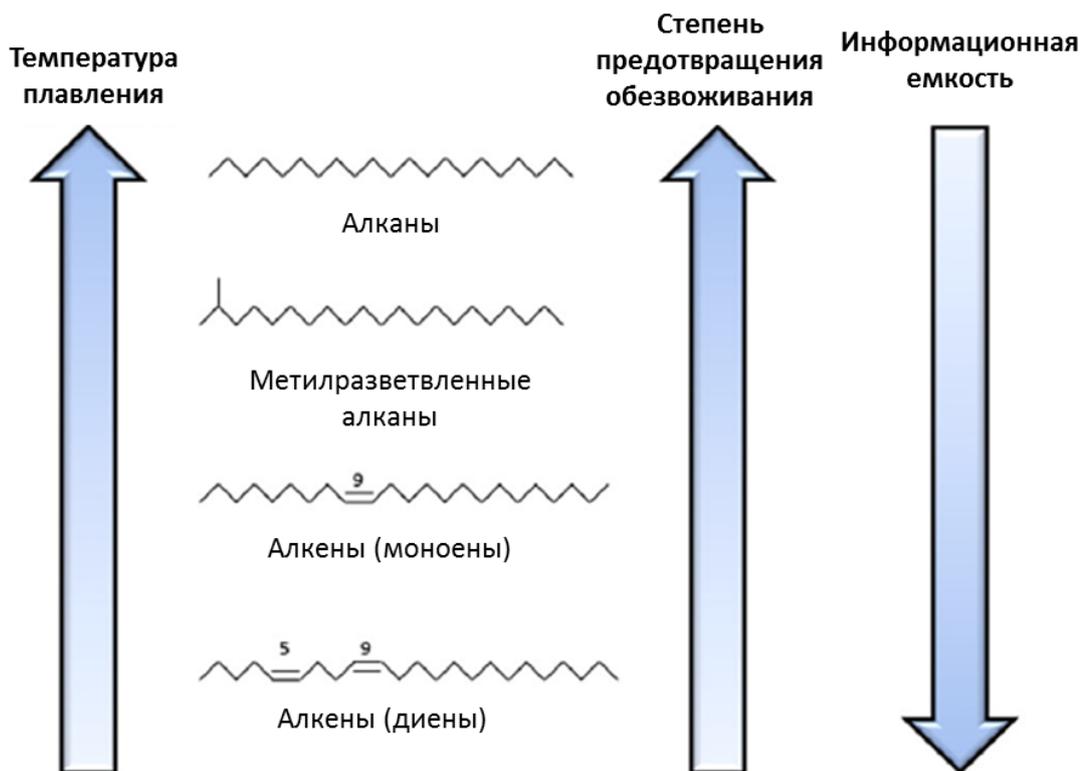


Рис. 1.3. Корреляция между точкой плавления кутикулярных углеводородов и их функциями согласно Чан и Кэрролл [52]

1.1.2. Композиционные изменения липидов у насекомых в процессе развития

Во многих работах рассмотрены композиционные изменения липидов в кутикуле и в целом теле в процессе онтогенеза. Так, в ряде работ описаны изменения углеводородного состава в кутикуле насекомых на разных жизненных фазах. В исследовании углеводородного состава кутикулы личинок, куколок и взрослых самок и самцов мух *Lucilia sericata* обнаружено, что у личинок и куколок основным компонентом в кутикуле был алкан *n*-C29 [53]. При этом содержание *n*-C25 было в 4 раза и *n*-C31 в 2 раза больше в кутикуле личинок по сравнению с куколками. В кутикуле куколок, помимо этого, наблюдалось большее содержание четных *n*-алканов по сравнению с личинками, хотя они были в минорных количествах. На взрослой стадии у самок и самцов основными *n*-алканами были C23, C25, C27, вместе они составляли 90% от кутикулярных углеводородов. К тому же у самок отсутствовали C15 и C18, а у самцов – C12 и C30. По общему количеству кутикулярных углеводородов наблюдалось увеличение в онтогенетическом ряду, при этом у самцов суммарное количество было в 2 раза выше по сравнению с самками. Такие изменения состава кутикулярных алканов авторы связывают с коммуникационной функцией: углеводороды выступают, по-видимому, в качестве контактных феромонов.

В кутикуле мухи *Lucilia cuprina* обнаружены предельные углеводороды состава C16-C30 [54]. У взрослых главными компонентами были разветвленные алканы C27 и C29 и в

небольших количествах *n*-C27 и *n*-C29. При этом содержание *n*-C29 и *n*-C30 было значительно выше у самцов, а *n*-C25, метилразветвленных C27 и C29 у самок. У куколок заметно повышалось содержание *n*-C27 и *n*-C29, и они становились основными компонентами. В работе подчеркивается, что разветвленные и нормальные углеводороды имеют разные биохимические пути синтеза. Также указывается, что кутикулярные липиды участвуют в контактной коммуникации.

Показано, что у взрослых пустынных цикад *Diceroprocta apache* общее количество кутикулярных углеводородов (в пересчете на насекомое) в 5 раз больше, чем у нимф [55]. По качественному составу углеводороды представлены рядом C16-C43. Основными компонентами во взрослой фазе являлись *n*-C27, 3-метилпентакозан, *n*-C31, *n*-C29, в фазе нимфы – C21, C23, C24, 3-метилпентакозан. Подобные изменения композиции кутикулярных липидов авторы объясняют адаптацией к разным средам обитания. Взрослые цикады живут в пустыне, где температура доходит до 50°C, и им нужна дополнительная защита от обезвоживания. Нимфы живут в почве, где потеря воды не так критична (воду получают, например, от корней).

В исследовании разных жизненных фаз каменной мухи *Pteronarcys californica* показано, что у взрослых особей больше количество поверхностных липидов и, в особенности, в 4 раза больше углеводородов и свободных кислот, чем у наяд [56]. В кутикуле идентифицированы *n*-алканы, *n*-алкены, 3-метилалканы и X-метилалканы. У взрослых выше содержание *n*-C25 и *n*-C23:1, у наяд – *n*-C27. Различия в количестве и составе кутикулярных липидов опять же объясняется разными средами обитания: взрослые живут на суше, наяды – в воде. Для взрослых главной опасностью является обезвоживание. Большее количество углеводородов и особенно линейных предотвращает потерю воды. К тому же взрослые мухи не питаются, поэтому обезвоживание для них особенно критично. Главная задача для них – размножение, и кутикулярные углеводороды играют роль контактных сигнальных веществ.

В работе по исследованию табачных жуков *Lasioderma serricorne* показано, что у взрослых особей в кутикуле в 4 раза больше углеводородов, по сравнению с личинками [57]. По качественному составу у личинок доминировали *n*-алканы (*n*-C28, *n*-C29, *n*-C31, *n*-C33 – основной компонент, *n*-C35), а у взрослых – моно- и диметилразветвленные алканы (3- и 11-метилгептакозаны, 11,15-диметилгептакозан, 10- и 12-метилоктакозаны, 13-, 11- и 3-метилнонакозаны, 11,15-диметилнонакозан). Авторы утверждают, что для обеих стадий обезвоживание – главная опасность.

Также есть пример исследования кутикулярной композиции углеводородов у взрослых мясных мух *Sarcophaga bullata* [58]. Было показано, что количество общих липидов и углеводородов было в несколько раз выше у 7-суточных насекомых, чем у только что вышедших из куколки. Количество моно- и диенов не отличалось. На всех фазах доминировали

нечетно-углеродные цепи. У взрослых также несколько выше содержание длинноцепочечных углеводов. Данные изменения обсуждаются в свете транспорта и депозиции углеводов в тканях и кутикуле. Авторы предполагают, что длинноцепочечные углеводороды, возможно, синтезируются на взрослой стадии для замещения истертых углеводов в кутикуле. В другой работе показано, что в кутикуле взрослых особей цветочного трипса *Frankliniella occidentalis* содержится повышенное количество нормальных алканов (*n*-C27, *n*-C31), но пониженное количество метилразветвленных компонентов (9-метилпентакозан, 9-, 11- и 13-метилгептакозаны) по сравнению с личинками [59].

При сравнительном анализе кутикулярных липидов взрослых самок и самцов, а также личинок II возраста подсолнечникового листоеда *Zygogramma exclamationis* показано, что основными компонентами кутикулы на всех трех фазах являлись предельные углеводороды [60]. В целом, самцы, самки и личинки имеют одинаковые компоненты, но в разных пропорциях. У самок и самцов главными углеводородными группами были внутренне разветвленные ди- и триметилалканы, в то время как у личинок преобладали *n*-алканы и диметилалканы. У самцов главными соединениями были 11,15- и 9,15- диметилгептакозаны и 13,17,21-триметилнонатриаконтан. У самок главным компонентом был так же 13,17,21-триметилнонатриаконтан. А у личинок главными углеводородами были *n*-нонакозан и 13- и 11-метилнонакозаны. Помимо этого у личинок в кутикуле были обнаружены четно-углеродные восковые эфиры с массой C44-C50, отсутствующие во взрослой фазе. В состав эфиров входили четно-цепочечные карбоновые кислоты C16-C24, а также неразветвленные спирты. Авторы полагают, что такое различие углеводородных профилей личинок и взрослых жуков обусловлено попаданием эпикутикулярных липидов подсолнечника на кутикулу личинок через поверхностный контакт или при питании. Было показано, что листья подсолнечника содержат воска и такие же *n*-алканы. В эпикутикуле всех фаз данного жука также были обнаружены терминально разветвленные моноалканы с замещением во 2-м положении: 2-метилтетракозан, 2-метилпентакозан, 2-метилгексакозан, 2-метилоктакозан, 2-метилдотриаконтан. Также был обнаружен короткий ряд 3-метилалканов с нечетно-углеродной главной цепью: C25, C27, C29.

Основными компонентами липидов целого тела насекомых являются триглицериды. В ряде работ показано, что максимальный уровень липидов наблюдается на фазе куколки. Так, у южноамериканской плодовой мухи *Anastrepha fraterculus* в начале фазы куколки происходит уменьшение уровня триглицеридов и затем подъем [61]. В течение фазы куколки наблюдается примерно одинаковый уровень триглицеридов, а в начале фазы имаго сильное снижение (~в 14 раз). Раннее уменьшение в начале фазы куколки, по-видимому, связано с прекращением питания. Триглицериды запасаются на фазе куколки для трат в начале взрослой стадии, когда насекомое еще не питается, а липиды расходуются на полет, поиск пищи и половых партнеров.

В этой же работе показано изменение содержания аминокислот и гликогена у исследуемых фаз жизненного цикла. В фазе куколки примерно одинаковый уровень, а в начале фазы имаго наблюдается сильный подъем. В начале фазы куколки происходит гистолиз, поэтому повышается уровень белка и аминокислот. Потом из этого запаса строятся белки у взрослого насекомого. Помимо этого на ранних стадиях аминокислоты выступают источником энергии (цикл трикарбоновых кислот и глюконеогенез) [62], как и гликоген.

На примере исследования липидов на разных фазах зерновой моли *Sitotroga cerealella* показано, что липиды – основной запас для насекомых, не питающихся во взрослой стадии: липиды занимают меньше места и у них больше энергетическая ценность [63]. Гликоген – относительно минорный метаболический резерв, расходуется при небольшом метаболическом стрессе. Т.о. триглицериды – главный метаболический резерв в процессе метаморфоза, запасующийся в конце личиночной фазы/ начальных стадиях фазы куколки и активно расходуемый в начале фазы имаго. Эти данные подтверждаются "U"-образной метаболической кривой – замедлением уровня метаболизма на фазе куколки. Это подтверждено на примере плодовой мухи *Drosophila melanogaster* уровнем выброса CO₂ [64]. Также показано, что в середине развития куколки (самая глубокая точка в метаболизме) метаболические скорости не зависят от температуры, и уровень метаболизма не лимитируется уровнем кислорода. Активность цитрат синтазы – модельная задача для оценки аэробного дыхания – также демонстрирует "U"-образную кривую. Но теоретически рассчитанная скорость метаболизма из активности цитрат синтазы выше, чем реально измеренные уровни (для только что вышедших имаго). Авторы считают, что это разница обусловлена затратами на полет, а первые несколько часов после выхода из куколки насекомое еще не летает.

Также имеются примеры работ по исследованию жирнокислотного состава эпикутикулы насекомых. В ранних работах еще высказывались сомнения, могут ли триглицериды быть компонентами эпикутикулы насекомых – считалось, что они попадают из внутренних слоев во время экстракции [55]. Показано, что более половины кутикулярных липидов имаго стрекоз *Aeschna grandis* и *Aeschna mixta* составляют триглицериды с основными кислотами C16:0 и C18:1 [65]. Также показаны различия в составе кутикулярных липидов на разных фазах жизненного цикла каменной мухи *Pteronarcys californica* [56]. У наяд триглицериды составляют 78% от кутикулярных липидов, у имаго – 7%. Такое резкое различие авторы объясняют сменой среды обитания: наяды живут в холодной воде, имаго – на суше; при комнатной температуре смесь липидов наяд плавится, но в холодной воде регулирует водный и солевой баланс. По качественному составу у имаго основными кислотами были C18:0, C18:1, C18:3, у наяд – C16:0, C16:1, C18:1. Помимо этого [57] показано, что у личинок табачного жука *Lasioderma serricorne* содержание триглицеридов в кутикуле также в 10 раз выше, чем у взрослых особей (41.3 и 4.3%

соответственно). Эти различия связываются с изменениями фаз жизненного цикла. При исследовании триатомовых клопов *Triatoma infestans* показано, что у нимф V возраста уровень триглицеридов в кутикуле в 2 раз выше, чем у самцов и в 3 раза выше, чем у самок [66]. Подобные изменения связываются с изменениями в возрасте, питании, половыми различиями.

Также есть примеры работ по исследованию изменения уровня свободных кислот в эпикутикуле. У мух *Lucilia sericata* [67] и *Calliphora vomitoria* [68] уровень свободных кислот был выше у куколок. При этом, предположительно, у самцов *Calliphora vomitoria* кислоты C20:3, C20:1, C21:0 и C22:0 вовлечены в сперматогенез, т.к. отсутствовали в других стадиях. А у самок кислоты C16:0, C17:1, C17:0, C18:2, C18:0 предположительно вовлечены в вителлогенез. Для взрослых особей мухи *Sarcophaga carnaria* показано, что уровень свободных ненасыщенных кислот C16:1, C17:1, C18:2, C19:1, C20:5, C20:4 и C20:1 в кутикуле был значительно выше по сравнению с личинками и куколками [69]. Помимо этого у самок наблюдалось повышенное содержание кислоты C20:5 как в кутикуле (в 7 раз), так и во внутренних липидах (в 90 раз) по сравнению с самцами. По мнению авторов полиненасыщенные кислоты C16:1, C18:1, а также C18:2 являются прекурсорами для половых феромонов [70,71]; кислота C20:5, вероятно, вовлечена в вителлогенез, а производные эйкозановой кислоты стимулируют откладку яиц. Похожие результаты получены и для имаго мухи *Sarcophaga argyrostoma*: наблюдалось повышенное содержание C16:1, C17:1, C18:1, C20:5 [72]. Авторы считают, что повышенное содержание C18:1 может служить адаптацией к холоду. Более того олеиновая кислота обеспечивает нужный уровень текучести клеточных мембран, поддерживает оптимальную работу мембранных белков и рецепторов.

1.1.3. Биосинтез эпикутикулярных углеводов насекомых

В организме насекомых биосинтез углеводов локализован в мембране эритроцитов, связанных с эпидермальным слоем или с периферическим жировым телом [1,2]. Транспорт синтезированных углеводов до кутикулы осуществляется при помощи липофорина. Детальный механизм, как углеводы переходят от липофорина через эпидермальные клетки к поверхности, пока неизвестен, возможно, в этом задействованы поровые каналы [2]. Однако, для чешуекрылых была открыта транспортная селективность в этом процессе: так, короткоцепочечные углеводородные феромоны или феромонные прекурсоры транспортируются к феромонным железам на брюшке, а длинноцепочечные кутикулярные углеводороды транспортируются сразу к поверхности тела [73,74].

Биосинтез углеводов у насекомых включает следующие стадии: 1) образование насыщенного или ненасыщенного линейного и метилразветвленного прекурсора C18; 2) удлинение длины цепи этих жирных кислот до длинноцепочечных ацилов-CoA; 3) конверсия длинноцепочечного ацила-CoA до спирта и 4) окисление спиртов до альдегидов, которые затем

окислительно декарбонилируются до углеводородов при помощи CYP4G ферментов [2] (рис. 1.4).

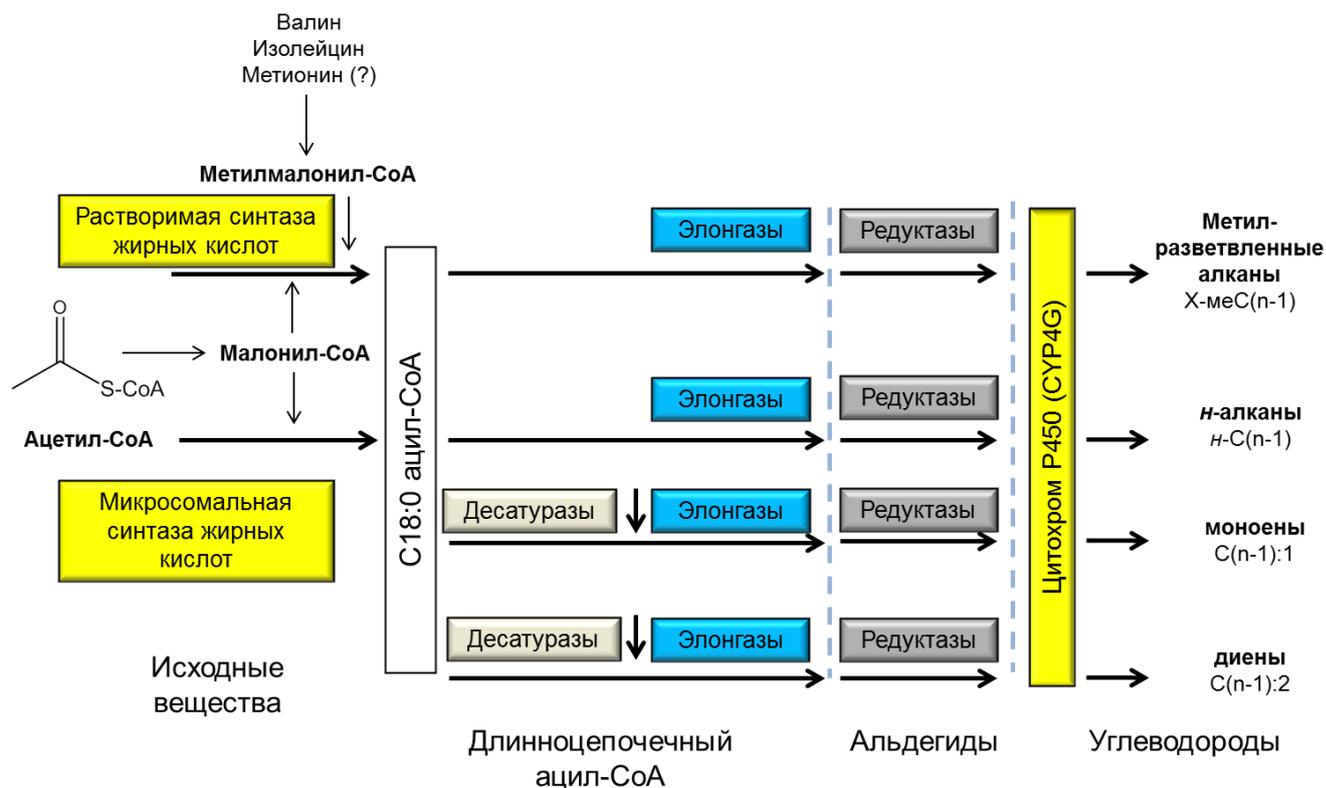


Рис. 1.4. Общая схема биосинтеза эпикутикулярных углеводородов насекомых [52]

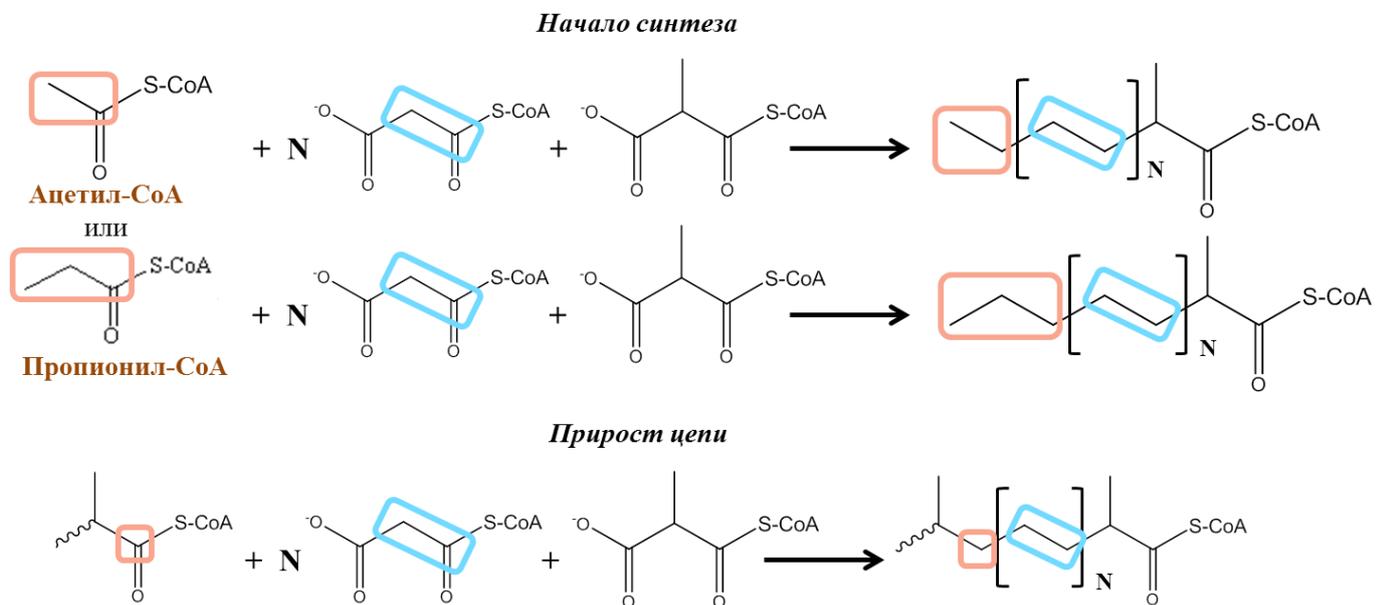
В синтезе углеродного скелета углеводородов задействовано несколько ферментов. Растворимая синтаза жирных кислот синтезирует линейный ацил C18:0, в то время как микросомальная синтаза жирных кислот синтезирует метилразветвленный скелет ацила C18:0 [75]. В случае ненасыщенных соединений на следующем этапе биосинтеза включаются десатуразы [75]. После этого 18-углеродный ацил переносится на элонгазы, которые продолжают наращивание углеродного скелета до нужной длины (>30 атомов C) [75]. Каждый этап приращения включает четыре реакции: конденсация длинноцепочечного ацила-СоА и малонила-СоА, восстановление кетона до спирта, дегидратация и восстановление [2]. Считается, что за контроль длины цепи ответственна первая стадия – конденсация [2]. Синтаза жирных кислот находится в форме димера [39]. У насекомых наблюдается несколько видов элонгаз с разной активностью у полов [76,77]. Редуктазы восстанавливают длинноцепочечный ацил-СоА до спирта. Заключительным этапом биосинтеза углеводородов является окисление спирта до альдегида с последующей конверсией до углеводорода на один атом углерода меньше. Эти две реакции осуществляет один фермент – цитохром P450 (CYP4G), обладающий оксидазной и декарбонилазной активностями [78].

Приращение скелета жирной кислоты происходит двууглеродными частицами, происходящими из малонил-СоА. Метильная группа в середине молекулы вставляется в скелет

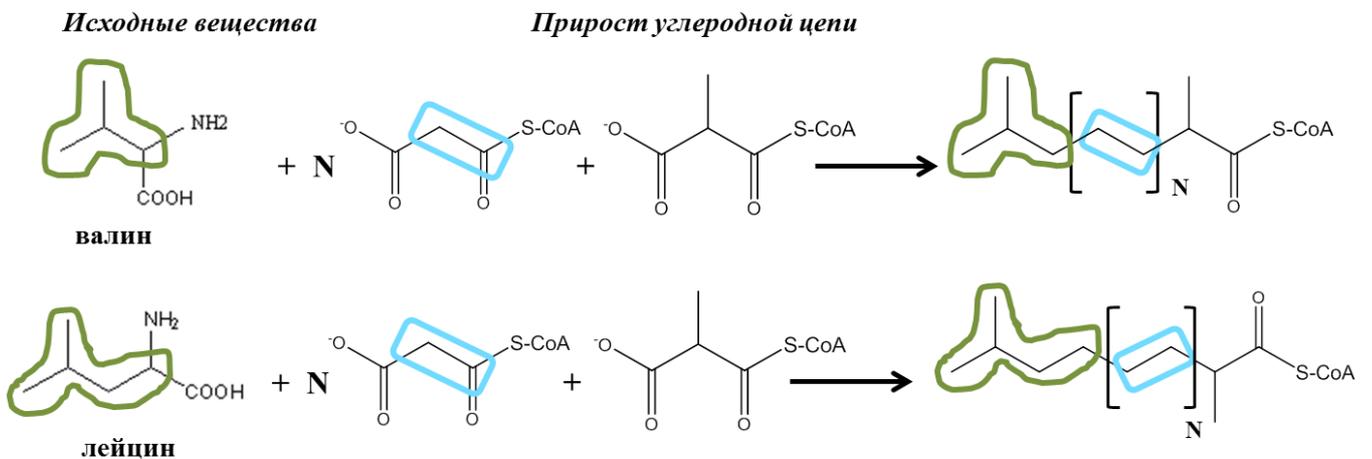
углеводорода из метилмалонил-CoA [1,6]. Источники метилмалонил-CoA различны у разных насекомых. Прекурсором данного соединения у насекомых с недостатком или отсутствием витамина B12 являются аминокислоты валин, изолейцин, метионин [2,79]. У насекомых, богатых витамином B12, например у термитов, источником метилмалонил-CoA служит сукцинат [80,81]. Исходным соединением для внутренне разветвленных углеводов могут быть ацетил-CoA или пропионил-CoA [1,6] (рис. 1.5).

Немного по-другому синтезируются метилразветвленные углеводороды с замещением во 2-м положении. Исходными веществами для них являются аминокислоты валин или лейцин, уже содержащие метильную группу будущего углеродного скелета (рис. 1.5) [1,6].

А) Внутренне разветвленные углеводороды



Б) Терминально разветвленные углеводороды



В) Обрыв углеродной цепи

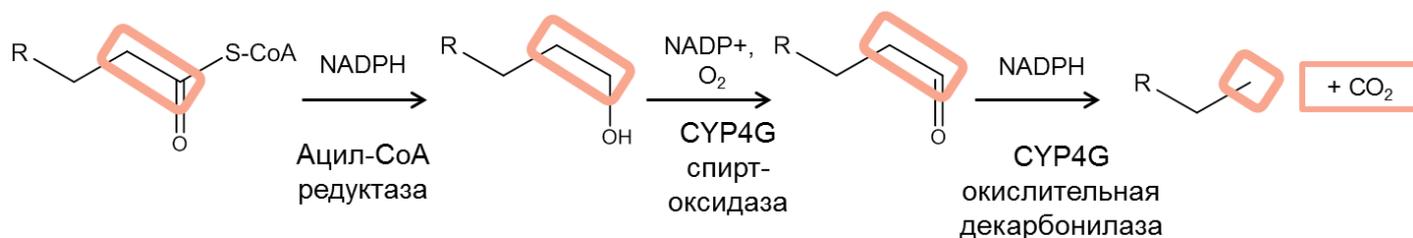


Рис. 1.5. Схема основных биохимических путей построения углеродного скелета метилразветвленных алканов [1,6]

В молекулах метилразветвленных алканов, кроме 2-метилалканов и симметричных моноалканов, появляется хиральный центр в месте разветвления углеродной цепи, поэтому возникает вопрос энантиомерной чистоты данных соединений. Впервые в работе [82] была определена абсолютная конфигурация метилразветвленных углеводородов, выделенных из 20 видов насекомых 9 отрядов сравнением удельного вращения с синтезированными стандартами. Все выделенные углеводороды оказались *R*-изомерами. В этой работе был предложен механизм биосинтеза метилразветвленных алканов с контролем абсолютной конфигурации на последней стадии двууглеродного приращения NADPH-зависимой еноил-редуктазой, восстанавливающей α,β -ненасыщенный тиоэфир (рис. 1.6). Более подробно вопрос стереохимии будет рассмотрен в разделе 1.1.5.

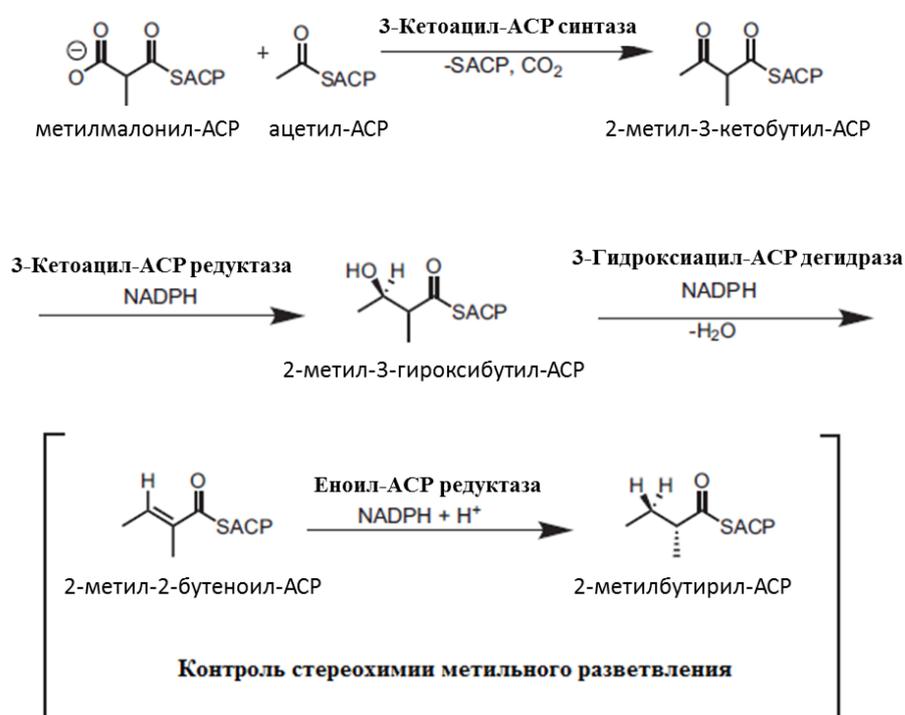


Рис. 1.6. Предположительный механизм биосинтеза метилразветвленных углеводородов у насекомых со стереохимическим контролем метильного разветвления [82]

1.1.4. Роль кутикулярных углеводов и жирных кислот в развитии микозов у насекомых

В первую очередь необходимо отметить, что энтомопатогенные грибы могут оказывать влияние на насекомых еще до заражения. Так, социальные насекомые, особенно живущие в почве, могут распознавать наличие грибов в почве, а также инфицированных особей по специальным химическим сигналам [13]. При воздействии *Metarhizium brunneum* у муравьев усиливается уровень груминга, а в присутствии зараженных особей – забота о потомстве и санитарное поведение [13].

Основные этапы развития грибной инфекции у насекомых включают адгезию спор к кутикуле, прорастание спор, проникновение гифальных тел через кутикулу в полость тела (гемоцель), колонизацию гемоцеля с образованием внутри насекомого плотного скопления гиф (склероция), на заключительном этапе выход гиф из колонизированного грибом трупа и споруляцию [4,13,25] (рис. 1.7).

Начальный этап в развитии грибной инфекции – адгезия конидий к поверхности насекомого [5,9,26]. Поверхность большинства конидий покрыта гидрофобными белками (гидрофобин) [13], и за пассивную адгезию отвечают неспецифические гидрофобные взаимодействия [83]. Следующий этап – прорастание спор и формирование аппрессориев. Аппрессории могут формироваться напрямую из конидий, на конце ростковых трубок или даже латерально из гиф. Далее гриб проникает в кутикулу, вырабатывая сложную смесь гидролитических ферментов: липазы, протеазы, хитиназы, фосфолипазу С и каталазу. Некоторые из этих ферментов определяют вирулентность патогена. Помимо этого энтомопатогенные грибы используют механическую силу для проникновения через покров насекомого [13].

После прорастания через кутикулу гриб внедряется в гемолимфу, где образует тонкостенные гифальные тела [25]. При высокой инфекционной нагрузке гифальные тела быстро колонизируют гемоцель: благодаря большому соотношению площади поверхности к объему они потребляют питательные вещества из гемолимфы и жирового тела и быстро разрастаются, после чего превращаются в гифы [13]. Рост и размножение гриба не очень интенсивны, пока хозяин жив; большинство гифальных тел концентрируется в местах проникновения, и интенсивная колонизация внутренних органов насекомого начинается после его гибели [25]. После заражения внутренних органов гифы начинают расти в обратном направлении – к поверхности тела. При этом гифы, находящиеся в прокутикуле, разрывают покровы и выходят на поверхность. После появления вегетативных тел начинается споруляция [25].

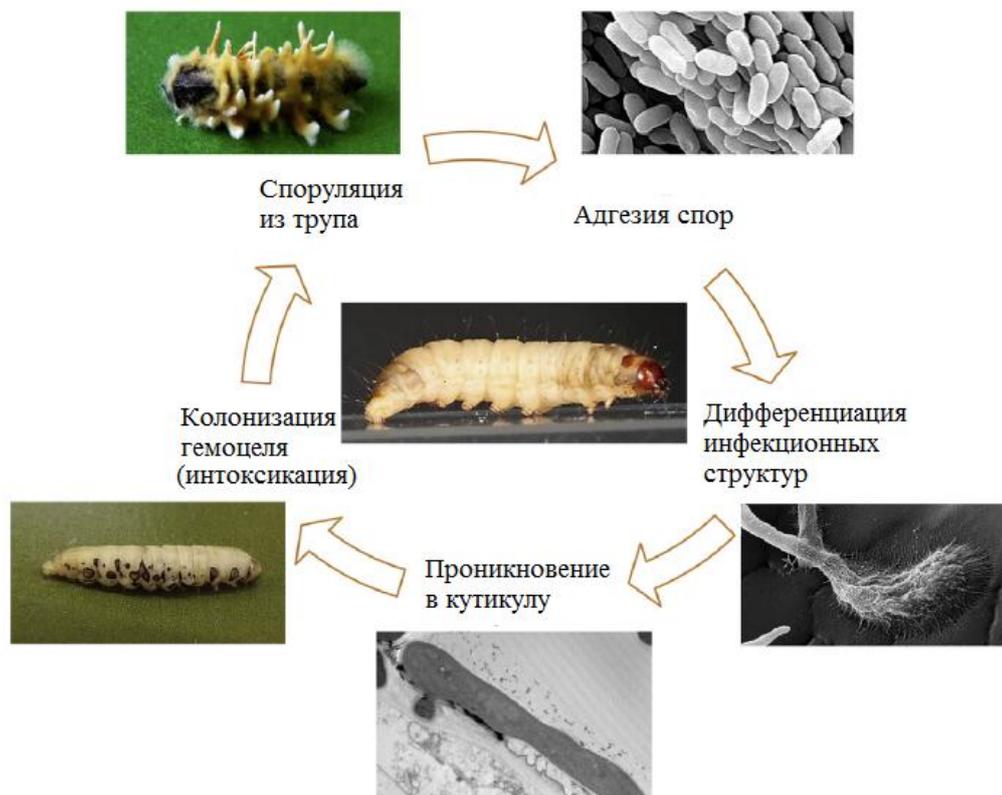


Рис. 1.7. Общая схема заражения энтомопатогенными грибами и развития микозов у насекомых [13]

В ряде работ показано, как соотносится липидный состав эпикутикулы насекомых с восприимчивостью к патогенным грибам. Педрини и соавторами [84] показано, что насекомые с преимущественно насыщенными и разветвленными углеводородами более чувствительны к патогенам, чем насекомые с ненасыщенными (алкены и/или алкадиены) компонентами. Показано, что более устойчивый к грибной инфекции *Conidiobolus coronatus* вид мясной мухи *Calliphora vicina* содержит большее количество свободных кислот (80% от эпикутикулярных липидов) по сравнению с восприимчивым сосновым шелкопрядом *Dendrolimus pini* (30%) [85]. Главными компонентами у обоих видов были C16:0, C18:1, C18:2, а у устойчивого вида *C. vicina* еще была кислота C16:1 и в следовых количествах короткоцепочечные кислоты C5-C12. Помимо этого показано, что у личинок восковой огневки *Galleria mellonella* в процессе развития последовательно увеличивается содержание кислот C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, что коррелирует с восприимчивостью к грибу *C. coronatus*. Для разных онтогенетических стадий мухи *Calliphora vomitoria* показаны различия в восприимчивости к паразитическому грибу *C. coronatus*: взрослые самки и самцы были весьма восприимчивы к патогену, тогда как личинки и куколки демонстрировали высокую устойчивость [86]. С точки зрения липидного состава во внутренних липидах личинок и куколок наблюдалось повышенное содержание короткоцепочечных и ненасыщенных свободных кислот (C12:0, C14:1, C14:0, C15:0 и C18:2) по сравнению со взрослыми особями.

При проведении сравнительного анализа кутикулярных липидов трех видов тараканов с разной восприимчивостью к грибу *Metarhizium anisopliae* в кутикуле наиболее устойчивых *Blatta orientalis* были идентифицированы кислоты C14:1, C18:3 (n6), C20:0, C20:2 и C22:0, отсутствовавшие в других восприимчивых видах [87]. Более того, в кутикуле имаго *Blattella germanica*, более устойчивых чем личинки этого же вида, обнаружены кислоты C21:0 и C22:6 ω3, отсутствовавшие в личинках и других видах.

Есть примеры работ, где показано, как соотносится уровень адгезии конидий со степенью полярности эпикутикулярных липидов [88]. После смыва липидов гексаном уровень прикрепления конидий *M. anisopliae* к экзuvia личинок клопов *Nezara viridula* уменьшался в среднем в 2.5 раза. Помимо этого уровень адгезии конидий на экстракте, полученном с помощью гексаном, был значительно выше по сравнению с экстрактами, полученными более полярными растворителями (CHCl₃-MeOH и MeOH-KOH). Главными компонентами гексанового экстракта были *n*-алканы с длиной цепи C13, C21-C31.

Для штаммов грибов *Beauveria bassiana* и *M. anisopliae* показано, что они могут расти на среде с *n*-алканами (*n*-C18 и *n*-C24) в качестве единственных источников углерода и успешно утилизировать их [89]. Также показан более интенсивный рост конидий на углеводородной фракции эпикутикулярного экстракта триатомовых клопов *Triatoma infestans* (основные компоненты – *n*-C29, *n*-C31, *n*-C33 и минорные – моно-, ди- и триметилалканы с длиной цепи C35, C37, C39). Похожие результаты были получены и при выращивании этих же штаммов на среде с *n*-C28 [90]. Более того, показано, что у гриба *B. bassiana*, выращенного на среде с *n*-гексадеканом, повышается вирулентность против фасолевой зерновки *Acanthoscelides obtectus* [91]. Помимо этого у выращенных на алкановой среде конидий уменьшалось соотношение ненасыщенные/насыщенные кислоты (увеличивалось содержание C16:0 и C18:2, но уменьшалось содержание C18:1).

Педрини и соавторами [4] описаны главные биохимические пути утилизации углеводов в организме грибов. Метаболизм *n*-алканов начинается с терминального окисления при помощи цитохром P450 монооксигеназ с выработкой первичных спиртов [4]. Далее спирты последовательно окисляются соответствующими дегидрогеназами до альдегидов и карбоновых кислот. Получившиеся кислоты активируются ацил-CoA синтазой и вступают в путь β-окисления (рис. 1.8). По поводу интеграции метаболизма алканов в центральные метаболические пути, считается, что преимущественно это цикл трикарбоновых кислот и глюконеогенез. Такой метаболический путь приводит к высокой концентрации восстановленных форм коферментов и ацетила-CoA, при этом последний включается в анаболические пути обмена [4].

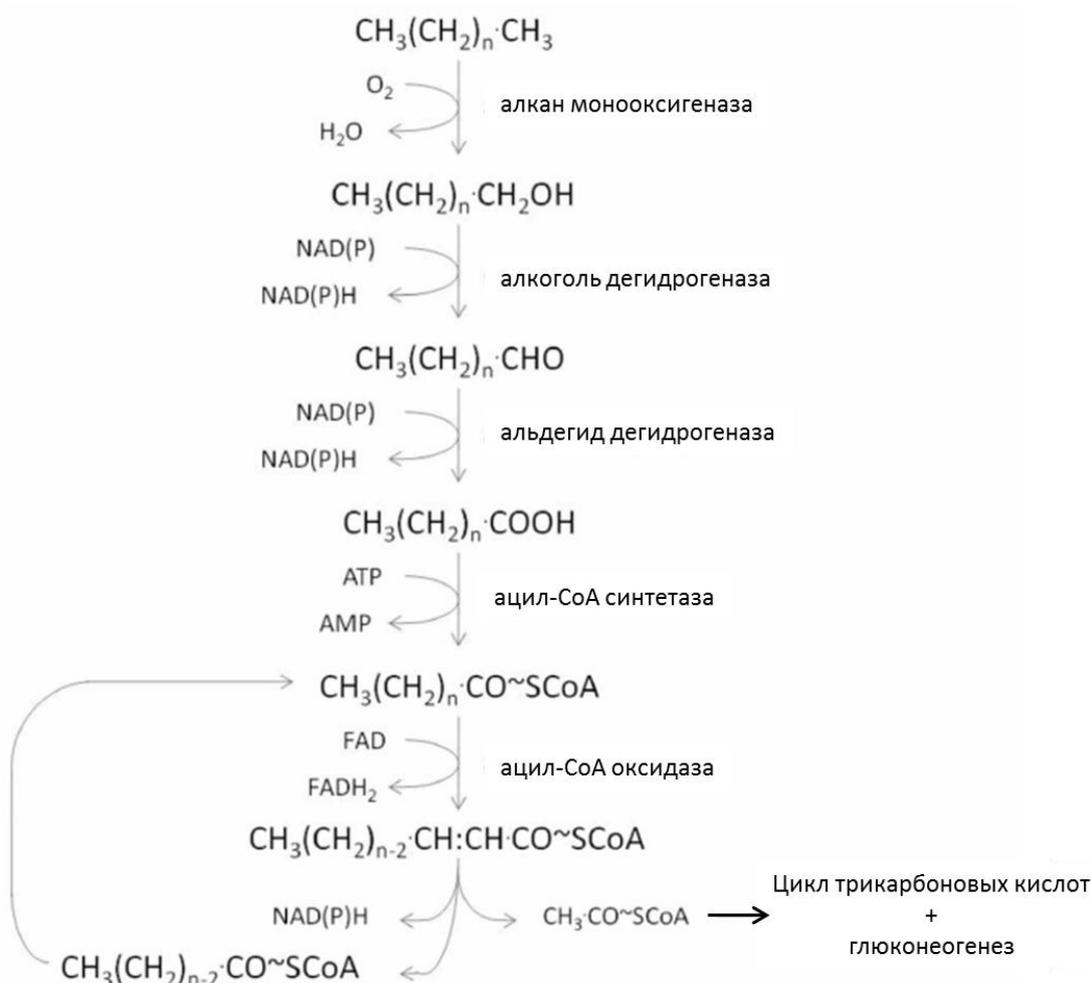


Рис. 1.8. Предположительные главные пути деградации алканов энтомопатогенными грибами согласно Педрини [4]

Педрини [4] считает, что действие гриба на поверхностные углеводороды при инфекции может оказывать значительный эффект на поведение насекомых. Так, при утилизации специальных феромонов могут изменяться поведенческие паттерны, такие как груминг, распознавание сожителей по гнезду и др.

В ряде работ показано, как меняется липидный состав эпикутикулы насекомых при заражении грибами. Так, показано, что в крыльях саранчи *Schistocerca gregaria* значительно сокращается содержание углеводов после инкубации с грибом *M. acridum* [92]. Главными компонентами являлись *n*-C27, *n*-C29, *n*-C30, *n*-C31. Также показано сокращение в количестве полярных компонентов (глюкоза, пептиды, аминокислоты). На начальных этапах инфекции личинок кукурузной огневки *Ostrinia nubilalis*, вызванной *B. bassiana*, выявлено 6-кратное сокращение общего содержания кутикулярных углеводов [93]. При этом значительно уменьшается концентрация всех детектированных углеводов, главными из которых являлись диметилгептакозан, *n*-алканы (C23-C30), 3-метилгептакозан. Но к концу инфекции (через 4 д) наблюдалось увеличение содержания кутикулярных углеводов. Подобные

результаты по флуктуации содержания углеводов были получены и для личинок майского хруща *Melolontha melolontha*, но у него главными компонентами были *n*-C23, *n*-C29, *n*-C31, цис-9-C25:1, транс-9-C25:1, цис-7-C25:1, *n*-C25 [93]. Авторы связывают эти эффекты с возможным проникновением углеводов из растущего гриба.

При инфицировании грибом *C. coronatus* самок таракана *B. orientalis* показано, что в кутикуле содержание *n*-C27 увеличивалось в 2 раза, содержание остальных *n*-алканов (C25, C26, C28, C29, C31) не менялось существенно [94]. Измерения проведены через 10 дней инфекции, но все насекомые были живы к этому времени. Этим же авторами показано [94] уменьшение содержания жирной кислоты C16:0 (почти в 2 раза) в процессе инфекции и увеличение содержания C18:1 по сравнению с контролем. У инфицированных насекомых полностью пропадали кислоты C7:0, C16:2, C17:1, C19:0, C20:4, C20:3, C20:2, C20:1, C20:0 и C22:0.

При инфекции, вызванной *B. bassiana*, у большого соснового долгоносика *Hylobius abietis* профиль жирных кислот не меняется (основные кислоты – C18:1, C16:0, C18:0, C18:2), но суммарное количество сокращается, как у самок, так и у самцов [95].

Помимо этого есть пример исследования изменения липидного состава целого тела личинок вощиной огневки *Galleria mellonella* при инфицировании и колонизации энтомопатогенными грибами *Metarhizium flavoviride*, *M. robertsii* и *Cordyceps fumosorosea* [96]. Во всех трех случаях заражения у насекомых появлялись кислоты C19:0 и C20:0, отсутствовавшие до заражения, но полностью исчезали длинноцепочечные кислоты C22:0 и C24:0. Более того, в случае заражения *C. fumosorosea* в липидном профиле личинок появлялась кислота C11:0, а при заражении *M. robertsii* – C13:0, при этом уровень ненасыщенных кислот C16:1, C17:1, C19:1 был в 2-5 раз выше, C20:1 в 60 раз выше по сравнению с обработкой другими штаммами и контролем. Подобное исследование было проведено и в работе [97]: авторы изучали изменение композиции жирных кислот жирового тела личинок жука *Zophobas morio* при заражении грибом *M. flavoviride*. В начале инфекции понижался уровень жирных кислот C18:2 и C18:1. Но далее, в процессе инфекции в жировом теле появлялись ненасыщенные кислоты C16:2 и C17:1, а также повышался уровень C16:1, C18:2 и C16:0. По мнению авторов такие изменения в жирнокислотном профиле могут быть следствием работы гидролитических ферментов гриба, разлагающих кутикулярные липиды с выделением свободных жирных кислот, которые используются грибом в качестве источника углерода. С другой стороны подобные изменения могут быть связаны с синтезом фунгицидных соединений насекомыми.

Имеется ряд работ, показывающих ингибирование или стимуляцию прорастания спор и роста мицелия энтомопатогенных грибов кутикулярными экстрактами насекомых или их

отдельными компонентами. Так, показано, что липидный экстракт личинок кукурузной совки *Heliothis zea* ингибировал прорастание конидий *B. bassiana* [98]. Главными компонентами экстракта были свободные короткоцепочечные насыщенные кислоты – С5:0, С8:0 (основной пик) и С9:0. Также было показано, что индивидуальные короткоцепочечные насыщенные кислоты С4-С9 ингибировали прорастание гриба. А кислоты С9:0, С10:0, С18:0 и С18:1 не ингибировали. Помимо этого показано, что короткоцепочечные кислоты С6:0-С12:0 ингибировали прорастание конидий и гифальный рост грибов *B. bassiana* и *C. fumosorosea* [99]. Но более длинноцепочечные кислоты (особенно миристиновая С14:0), наоборот, активировали рост *C. fumosorosea*. Также авторами показано, что действие кислот было фунгистатическим, и после обработки каприновой кислотой С10:0 гриб *B. bassiana* терял вирулентность по отношению к личинкам тутового шелкопряда. Похожие результаты получены и для короткоцепочечных (С6:0, С11:0, С13:0) и ненасыщенных кислот (17:1, 18:3, 20:3, 20:4 и 20:5): данные кислоты более эффективно ингибировали рост энтомопатогенных грибов *M. anisopliae*, *C. fumosoroseus*, *Purpureocillium lilacinum*, *Akanthomyces lecanii*, *B. bassiana*, чем насыщенные кислоты [69]. Также показано, что экстракты кутикулы и целого тела мухи *Sarcophaga carnaria* ингибировали рост грибов, но отличий между экстрактами из разных онтогенетических стадий не наблюдалось. Для свободных кислот С14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0 и 20:1 показано ингибирование роста гриба *C. coronatus in vitro*: снижалось спорообразование, уменьшалась гифальная биомасса, снижалась вирулентность и выработка токсинов [100]. Подобные результаты получены и в других работах. Так, кислота С18:2 оказывала фунгистатический эффект на конидии *Erynia* [101]; небольшие концентрации С18:2 и С18:3 оказывали повреждающий эффект на прорастание спор и рост мицелия [101]; а короткоцепочечные кислоты С8:0 и С10:0 ингибировали прорастание *M. flavoviride* [102].

Есть работы по противогрибковым свойствам жирных кислот и механизму их действия в клетках гриба [103]. Мишенью свободных жирных кислот могут являться клеточные мембраны. Противогрибковые жирные кислоты встраиваются в липидный бислой грибной мембраны, повышая ее текучесть, что приводит к общей дезорганизации клеточной мембраны, конформационным изменениям мембранных белков, выбросу внутриклеточных веществ, цитоплазматической дезорганизации и, в конечном итоге, к клеточной гибели. Существует связь между структурой жирных кислот и их биоактивностью. Так, противогрибковая активность насыщенных кислот повышается с увеличением длины цепи. Однако увеличение гидрофобности может приводить к уменьшению растворимости в воде и препятствовать достижению необходимой концентрации для взаимодействия с ацильными остатками мембранных фосфолипидов. Лауриновая кислота С12:0 имеет оптимальное соотношение гидрофобных и гидрофильных групп, что расширяет спектр ее мишеней-грибов [103]. Еще

одной мишенью карбоновых кислот в организме гриба является N-миристоилтрансфераза – фермент, прикрепляющий миристиновую C14:0 кислоту к амино-терминальному глицину белков [103]. Данная модификация важна для прикрепления белков к клеточной мембране. В основном, ингибиторами N-миристоилтрансферазы являются окса-производные тетрадекановой кислоты [103,104]. Ацетиленовые жирные кислоты с тройной связью C≡C, как показано в [104], ингибируют элонгацию насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, а также процесс ацилирования, в частности при биосинтезе триацилглицеридов. А метоксипроизводные тетрадекановой кислоты ингибируют β-окисление [105].

Свободные жирные кислоты могут влиять на активность гидролитических ферментов гриба, определяющих его вирулентность. Так, показано, что свободные кислоты C12:0, C16:1 и C20:1 из кутикулы *G. mellonella* понижают протеолитическую активность *C. coronatus*, а C10:0 и C16:0 понижают активность хитиназы и липаз [106]. Помимо этого кислота C17:0 значительно понижала активность хитиназы в крыльях имаго *G. mellonella*. Показано, что уровни кислот C6:0, C9:0, C10:0, C16:0 и 20:0 в кутикуле и C15:0, C16:0, C17:0 и C20:3 в целом теле тараканов *B. orientalis* и *B. germanica* коррелировали со снижением активности протеаз *C. coronatus* [15]. Уровни кислот C18:0 и C18:2 в кутикуле и C17:1, C18:2 и C20:4 во внутренних липидах коррелировали с понижением хитиназной активности гриба. Помимо этого содержание кислоты C20:3 во внутренних липидах отрицательно коррелировало с липазной активностью в оотеке.

Углеводороды стимулируют прорастание грибов. Так, линейные углеводороды состава C24–C36 значительно усиливали прорастание конидий *Metarhizium acridum in vitro*, и обработка кутикулы насекомого пентаном (для удаления неполярных кутикулярных соединений) приводила к уменьшению уровня прорастания [92]. Экстракты эпикутикулы колорадского жука, содержащие алканы состава C25–C38, усиливали прорастание *M. robertsii*, *M. brunneum* и *Metarhizium pemphigi* [107,108]. У линии восковых огневок, восприимчивых к *M. brunneum*, было повышенное содержание в кутикуле алканов и алкенов и высокий уровень прорастания конидий на кутикуле по сравнению с резистентной линией [109].

Таким образом, углеводороды чаще всего стимулируют как адгезию, так и прорастание и рост грибов. При этом они могут активно утилизироваться, влиять на дифференциацию инфекционных структур и вирулентность патогена. Короткоцепочные и ненасыщенные жирные кислоты преимущественно ингибируют прорастание и рост грибов. Насыщенные жирные кислоты чаще всего нейтральны или слабее ингибируют рост.

1.1.5. Значение эпикутикулярных углеводов в коммуникации

Необходимо кратко осветить еще одну важную функцию кутикулярных липидов – участие в химической коммуникации, поскольку данная функция тесно связана с онтогенетическими изменениями липидного состава, исследуемого в нашей работе.

Химические сигнальные вещества регулируют меж- и внутривидовые отношения, взаимодействия между хищником и жертвой [110], между паразитами и хозяевами [111], отношения между особями одного и разных полов [112-118]; между кастами, группами и когортами у социальных насекомых [119,120], участвуют в химической мимикрии [121] и т.д. В химической экологии существует следующая классификация химических сигнальных веществ [122]: алломоны вырабатываются одним организмом и влияют на особей другого вида. При этом синомоны оказывают выгоду обоим видам, кайромоны же оказывают пользу виду, на которого направлено действие сигнальных веществ. Феромоны участвуют в регулировке отношений внутри одного вида (половые феромоны, феромоны скопления).

Существуют два основных пути передачи химического сигнала: воздушный – с участием летучих феромонов, синтезируемых в эпикутикулярных железах и контактный – с участием нелетучих веществ кутикулы посредством механического контакта между покровами насекомых [1].

Большое значение на проведение коммуникационных сигналов играет абсолютная конфигурация метилразветвленных углеводов. Так, для 20 видов насекомых из 9 отрядов была определена абсолютная конфигурация основных монометилалканов [82]. Оказалось, что все углеводороды имеют **R**-конфигурацию. В биотестах с синтетическими стандартами показано, что самцы длиннорогого жука *Neoclytus acuminatus acuminatus* (F) более активно реагируют на смесь из трех феромонов, обнаруженных в кутикуле: 7-метилпентакозан, 7-метилгептакозан и 9-метилгептакозан, все в **R**-конфигурации [123]. Смена же на **S**-конфигурацию в 7-метилгептакозане значительно снижает поведенческий ответ. С помощью синтетических стандартов показано, что смесь (5**S**)-метилгептакозана и (5**R**,17**S**)-диметилгептакозана привлекает самцов паразитических ос *Ooencytrus kuvanae* [124], в то время как смесь (5**R**)-метилгептакозана и (5**R**,17**S**)-диметилгептакозана отталкивает. Помимо этого показано, что один из феромонов самцов весенней пяденицы *Lambdina athasaria* и сосновой пяденицы *L. pellucidaria* является мезо-изомером: (7**S**,11**R**)-диметилгептадекан [125,126].

Приведенные примеры показывают, что насекомые могут синтезировать разные энантиомеры и различать их в половых коммуникациях. Авторы работы [82] считают, что метилразветвленные углеводороды, задействованные в защите от испарения и других защитных функциях, биосинтезируются в **R**-форме, в то время как соединения, задействованные в сигнальных функциях, могут синтезироваться в различных стереоизомерных формах для того, чтобы различать их от общих метилразветвленных углеводов, не задействованных в сигнализации. Тем не менее, остается неясным, является ли способность различать стереоизомеры метилразветвленных углеводов повсеместным явлением у насекомых [2].

1.1.6. Состав экикулярных липидов исследуемых видов насекомых и их восприимчивость к энтомопатогенным грибам

1.1.6.1. *Колорадский жук (L. descendineata)*. Одно из наиболее полных исследований кутикулярных углеводов колорадского жука было проведено Нельсоном и соавторами [6]. Исследовались яйца и имаго (самцы и самки). Были идентифицированы предельные моно-, ди-, три- и тетраметилразветвленные углеводороды состава C27-C58, всего 79 соединений. Основными компонентами являлись ди- и триметилалканы с одним из замещений во 2-м положении (52.9% у самцов, 65.1% у самок, 71.9% в яйцах). Более того, содержание многих компонентов было значительно выше (более чем в 2 раза) у самок по сравнению с самцами. К таковым относились 2-метилоктакозан, 2,10- и 2,6-диметилоктакозаны, 2,10,16-, 2,10,18-триметилоктакозаны, 2,12-, 2,10-диметилтриакоктаны и 2,10,16-, 2,10,18-триметилдотриакоктаны. Можно предполагать, что данные соединения играют роль контактных феромонов в половом распознавании. В яйцах было меньшее количество внутренне разветвленных углеводов. *n*-Алканы и алкены содержались в следовых количествах.

Также есть пример исследования кутикулярных липидов элитр и конечностей имаго колорадского жука [41]. Были идентифицированы 55 моно-, ди- и триметилразветвленных алканов состава C26-C37. Основными компонентами были 2,6-диметилоктакозан и 2-метилтриакоктан. Качественных и количественных отличий между элитрами и конечностями не наблюдалось. Других компонентов кроме предельных углеводов обнаружено не было.

При исследовании изменения углеводородного профиля в кутикуле имаго колорадского жука в период диапаузы и вне диапаузы. Были идентифицированы предельные моно-, ди-, три- и тетраметилразветвленные углеводороды состава C25-C53 [7]. Главными компонентами были ди- и триметилразветвленные алканы с разветвлением во 2-м положении. Выявлено, что с 1-го по 7-й день диапаузы углеводородный профиль сдвигается в более тяжелую область. В 1-й день главными компонентами были 2,17- и 2,6-диметилоктакозаны, 2,10,18- и 2,10,16-триметилоктакозаны. На 4-й день появлялись 2,10,16-триметилдотриакоктан, 2,10,16-, 2,12,18-, 2,10,18-триметилтетратриакоктаны, 2,10,18-триметилгексатриакоктан, 2,10-, 2,12-диметилдотриакоктаны, 11,17-диметилтриакоктан, 2,16-, 2,10-диметилтетратриакоктаны, 13,19-, 11,17-, 11,23-диметилпентатриакоктаны. На 7-й день происходил явный сдвиг в более тяжелую область C32-C37, и главными компонентами становились 2,10,16-, 2,12,18-, 2,10,18-триметилтетратриакоктаны. Максимальное содержание углеводов наблюдалось на 7-й день и оставалось примерно на том же уровне до 15-го дня. Большое количество тяжелых углеводов, по мнению авторов, обеспечивает улучшенную способность предотвращать потерю воды в период зимовки. У насекомых вне диапаузы наблюдается подобная композиция

кутикулярных углеводов и схожее изменение в содержании с течением времени. Примеров исследования эпикутикулярных липидов личинок и куколок колорадского жука нет.

Работ по исследованию жирнокислотного состава эпикутикулы так же немного. Есть пример исследования липидной фракции целого тела имаго колорадских жуков [127]. Разделение исходных и гидролизованных (метанол + серная кислота) триглицеридов проводили в тонком слое, а затем анализировали с помощью капиллярной газовой хроматографии с масс-селективным и пламенно-ионизационным детекторами. Основными компонентами были триглицериды, состоящие на 90% из пальмитиновой C16:0 и олеиновой C18:1 кислот.

Описан липидный состав внутренних липидов имаго колорадского жука в период начала диапаузы и вне диапаузы [7]. Основными компонентами внутренних липидов были триацилглицериды состава C50, C52, C54. Основными кислотами, входящими в состав триглицеридов были C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 или C18:3. Идентификацию проводили методом ГХ/МС без дериватизации триглицеридов. Композиционный состав основных триглицеридов не отличался значительно у диапаузирующих насекомых и насекомых вне диапаузы. Однако у насекомых вне диапаузы повышалось содержание нечетно-углеродных триглицеридов C51, C53, C55. В состав триглицеридов C51 и C53 входят остатки кислот C15:0 или C17:0, в C55 – кислота C19:0. У диапаузирующих насекомых к началу диапаузы значительно (9-кратно) увеличивалось содержание триглицеридов по сравнению с началом взрослой стадии после выхода из куколки. Авторы считают, такое запасание липидов необходимо для выживания колорадского жука в период зимней диапаузы. Подобное запасание характерно для насекомых, имеющие длительный период метаболической активности, такой как миграционный перелет или диапаузу, или непитающуюся стадию (куколка или имаго). В другой работе этой же исследовательской группы [128] показано, что в период с 7-го по 15-й день диапаузы колорадского жука значительно падает уровень метаболизма и дыхания. Запасание триглицеридов – универсальный механизм пережития зимы или периода с ограниченным питанием (характерно для насекомых с полным превращением или с длинным миграционным полетом). Авторы полагают, что отличается только конечное расходование запасенных липидов: резервы в диапаузе или размножение, полет, поиск пищи у активных насекомых. Авторы работы [129] так же показали, что в диапаузе у колорадского жука выше уровень липидов: в 2 раза выше по сравнению с активными и в 1.5-1.7 выше по сравнению с периодом после диапаузы. Помимо этого показаны разные уровни активности двух белков-перелипинов: один (LSD1) гидролизует жиры на активных стадиях, другой (LSD2) запасает жиры, защищает от липаз. Авторы полагают, жиры запасаются в преддиапаузный период. Эти данные подтверждают запасующую роль липидов в периоды низкой активности (куколка, диапауза имаго).

Показано, что личинки и имаго колорадского жука восприимчивы к разным видам энтомопатогенных грибов [130], в том числе к видам рода *Metarhizium*. При этом наиболее вирулентными были штаммы *M. robertsii* [107, 131], которые вызывали наиболее высокую смертность как в лабораторных, так и в полевых условиях. Также показано, что экстракты эпикутикулярных липидов личинок колорадского жука стимулируют прорастание конидий разных видов *Metarhizium* [107]. Помимо этого показано, что только что перелинявшие в IV возраст личинки (4-6 ч после линьки) более восприимчивы к *M. robertsii*, по сравнению с заканчивающими развитие личинками (5 дней после линьки) [17]. Однако в литературе нет примеров того, как изменения в восприимчивости к грибам связаны с изменением липидной композиции эпикутикулы разных фаз и стадий развития колорадского жука.

1.1.6.2. Саранчовые. К настоящему моменту достаточно полно охарактеризованы липиды эпикутикулярного слоя разных видов саранчовых. Оба исследуемых вида – *L. migratoria* и *C. italicus* – являются опасными вредителями множества сельских культур. Оба представителя образуют стадную форму – плотные скопления личинок – кулиги и взрослых особей – стаи, которые живут, питаются и движутся совместно. Кулиги саранчи в годы массового размножения могут занимать огромные площади (до нескольких тысяч гектаров) и преодолевать большие расстояния (до 300 км), поедая все на своем пути [132].

Перелетная саранча (*L. migratoria*) – один из самых распространенных видов в Восточном полушарии. Ареал перелетной саранчи огромен, он включает практически все умеренные и тропические области Восточного полушария [133]. Исследуемый нами подвид *Locusta migratoria migratoria* обитает в Западной и Центральной Азии и в Восточной Европе [132]. С точки зрения гигротермических предпочтений перелетная саранча – мезоксерофил, селящийся по берегам рек, озер и морей с зарослями тростника и осоки [18]. По своему пищевому режиму азиатская саранча довольно узкий олигофаг, предпочитающий злаки (тростник, пырей, вейник) [134].

Локи и Ораха [8] проведен детальный анализ кутикулярных углеводов имаго перелетной саранчи, в частности ее подвида *L. migratoria migratorioides*. *n*-Алканы составляют половину идентифицированных углеводов. Доминирующими были *n*-C27, *n*-C29 и *n*-C31. Среди монометилразветвленных алканов был идентифицирован ряд 3-метилразветвленных гомологов с длиной главной цепи от C25 до C31. Основным компонентом данной группы был 3-метилнонакозан. Идентифицированные монометилалканы составляли гомологические ряды C25-C34 с положение метильной группы от 9-го до 17-го атома углерода. Помимо этого были идентифицированы 4-метилоктакозан и 5-метилнонакозан. Основными монометилразветвленными компонентами были алканы с нечетным положением разветвления – 9, 11, 13 и (15) с длиной главной цепи C29, C31, C33. Среди диметилалканов были

обнаружены изомеры с длиной цепи C31-C37. Главными компонентами были – 13,21-диметилпентатриаконтан, 11,21- и 13,19-диметилтриаконтаны и 12,20- и 13,21-диметилтетрааконтаны.

Помимо этого были проанализированы кутикулярные липиды у стадной и одиночной форм подвида азиатской саранчи *L. migratoria cinerascens* из Сардинии [135]. Показано, что у одиночных форм углеводородный профиль сдвигается в более тяжелую область; эта тенденция особенно проявляется для нормальных углеводородов с нечетным углеродным числом – *n*-C27, *n*-C29, *n*-C31, *n*-C33. В ряду личинки-имаго уменьшается содержание монометилалканов с разветвлением в нечетном положении и нечетным числом атомов углерода в главной цепи: 11- и 13-метилгептатриаконтаны, 11-, 13- и 15-метилтриаконтаны, 13-, 15- и 17-метилпентатриаконтаны. Но при этом у взрослых особей наблюдалось более высокое содержание почти всех диметилалканов по сравнению с личинками. Помимо этого у самок было выше содержание отдельных диметилалканов: 12,20-, 12,22- и 13,21-диметилтетрааконтанов, 13,21- и 13,23-диметилпентатриаконтанов, 13,21- и 13,23-диметилгептатриаконтанов. Половые различия были незначительные, но более проявлялись в случае одиночной формы.

В другом исследовании показано, что основными компонентами поверхностных липидов крыльев и конечностей азиатской саранчи *Locusta migratoria* являются нормальные алканы *n*-C29 и *n*-C31 [136]. А в крыльях также преобладают разветвленные углеводороды C30.

В отличие от углеводородного состава данных по полярным компонентам кутикулы саранчовых немного. Так, в [136] проведен детальный анализ состава секрета с лапок, полученные отпечатками на покровном стекле, и смывов поверхностных липидов лапок и крыльев. Среди полярных компонентов идентифицированы свободные и связанные жирные кислоты (моно- и возможно диглицериды, воска), глицерин, и спирты. В смывах из крыльев доминируют длинноцепочечные кислоты C28-C30, а из лапок – кислоты C18:0 и C20:0, в то время как в «отпечатках» преобладают жирные кислоты C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 и C18:3. Помимо этого в «отпечатках» наблюдалось высокое содержание сахаров (20% от всех органических веществ) – преимущественно ди-, три- и олигосахариды. Полученные различия авторы обсуждают в свете роли секретов как «смазочного материала». Высокое содержание сахаров, глицеридов и жирных кислот делает его вязким, что важно для прикрепления насекомого к разным поверхностям.

Ораха и Локи [137] изучали полярные компоненты экстракта эпикутикулярного слоя азиатской саранчи *L. migratoria migratoriodes*. Было идентифицировано четыре основных класса: воска, свободные кислоты, свободные спирты и триглицериды. Предварительно липиды были разделены на фракции методом тонкослойной хроматографией, дальнейший анализ

проводили на газовом хроматографе, отнесение проводили сопоставлением рассчитанных индексов удерживания со стандартами. Установлено, что воска составляли 7.4% у самцов и 11.4% у самок от суммы липидов. В состав восков входили кислоты C10-C22 с преобладанием 16:0, 18:0, 14:0, 20:0; ненасыщенные кислоты составляли 5% от фракции восков. В ряду спиртов в составе восков доминировали первичные спирты C14, C16, C18, C21, C22. Свободные кислоты были представлены рядом C10-C22 и составляли 7.4% и 4.6% от кутикулярных липидов у самцов и самок соответственно. Главными свободными кислотами являлись 16:0, 14:0, 15:0, 18:0. Ненасыщенные кислоты составляли 15.7% от фракции свободных кислот. Среди идентифицированных свободных первичных спиртов C10-C34 преобладали четно-углеродных структуры – C14, C18, C22, C16, общее содержание не превышало 4% от кутикулярных липидов. Основная фракция кутикулярных липидов была представлена триглицеридами, они составляли половину от суммы липидов. Подобные результаты, по мнению авторов, связаны с процедурой экстракции. В состав триглицеридов входили кислоты C10-C22 с преобладанием C16:0, C18:0 и C20:1 у обоих полов, и C14:0 у самок и C18:2 у самцов.

Второй исследуемый вид – итальянский прус *C. italicus*. Область распространения итальянского пруса охватывает значительную часть Средиземноморья и большую часть Западной Азии [19]. Итальянская прус – ксерофил, предпочитающий полынные степи и полупустыни с мозаичным травяным покровом. Предпочитаемая кормовая база – разные виды полыни. На сегодняшний день отсутствуют исследования кутикулярных липидов *C. italicus*. Однако имеется достаточно работ по кутикулярным липидам другого вида саранчи с похожими эколого-климатическими преференциями – *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1755), пустынная или африканская саранча. Пустынная саранча широко распространена в тропиках и субтропиках Африки, Малой Азии и Индии [138,139].

В эпикутикулярном слое *S. gregaria* Локи и Ораха [8] обнаружили *n*-алканы, терминально и внутренне разветвленные монометилалканы, диметилалканы, присутствующие и в эпикутикуле перелетной саранчи, а также триметилалканы, которых нет у *L. migratoria*. *n*-Алканы были основной группой у *S. gregaria*, при этом их среднее содержание было на 20% выше, чем у *L. migratoria*. В ряду *n*-алканов основными были *n*-C27 и *n*-C29. Содержание 3-метилалканов у *S. gregaria* было значительно ниже, чем у *L. migratoria*, основным компонентом был так же 3-метилнонакозан. Содержание внутренне разветвленных монометилалканов не отличалось значительно у двух видов саранчи. В эпикутикуле *S. gregaria* обнаружены метилалканы с длиной цепи C29-C35 и положением метильного разветвления от 9-го до 15-го. Основными монометилалканами у пустынной саранчи были 9-, 11-, 13- и 15-метилтриаконтаны и 11- и 13-метилгентриаконтаны. Был обнаружен 5-метилнонакозан в

следовых количествах. Содержание диметилалканов также не отличалось значительно у двух указанных видов. В *S. gregaria* гомологический ряд диметилалканов был представлен углеводородами с длиной цепи C29-C35, главными изомерами были 9,13-, 11,15- и 13,17-диметилтриакоктаны и 9,13-, 11,15- и 13,17-диметилгентриакоктаны. Содержание триметилалканов не превышало 1.5%. Идентифицированные изомеры составляли короткую гомологическую серию C31, C33, C35. В целом, спектр идентифицированных углеводородов *S. gregaria* был беднее, чем у *L. migratoria*, но по диапазону молекулярных весов спектры в двух видах были примерно одинаковые. Локи [140] также исследовался углеводородный профиль кутикулы пустынной саранчи. Были идентифицированы *n*-алканы C22-C33, монометилалканы, один диметилалкан и триметилалканы. Как и в работе [8] количество идентифицированных соединений было меньше по сравнению с азиатской саранчой.

В другом исследовании показаны возрастные различия в составе кутикулярных углеводородов подвида *S. gregaria ssp. gregaria* из Африки [141]. Было определено пять групп углеводородов: *n*-алканы, терминальные и внутренние монометилалканы, диметилалканы и триметилалканы. У личинок V возраста *S. gregaria gregaria* основным *n*-алканом был *n*-C29. Среди терминально разветвленных алканов были определены 3-метилгептакозан, 3-метилнонакозан и 3-метилгентриакоктан, но они находились в следовых количествах. Доминирующий пик во всем углеводородном профиле содержал внутренне разветвленные моноалканы – 9-, 11-, 13- и 15-метилтриакоктаны. Вдобавок, наблюдалось значительное количество 9-, 11-, 13-метилгентриакоктанов. Среди диметилалканов главными компонентами были 9,13-, 11,15- и 13,21-диметилтриакоктаны. Помимо этого в заметном количестве наблюдались 13,21- и 13,23-диметилнонатетракоктаны и 13,21- и 13,23-диметилгептатетракоктаны. В эпикуткуле были идентифицированы триметилалканы, общее содержание не превышало 2%. Наиболее интенсивными были 11,15,19-триметилгентриакоктан и 9,13,21-триметилтриакоктан. У взрослых особей *S. gregaria gregaria* картина углеводородного профиля принципиально не отличалась, но заметно снизилось содержание моноалканов с длиной главной цепи C33, и увеличилось содержание диметилизомеров с длиной главной цепи C33. Также более чем в 2 раза снизилось содержание моноалканов с длиной цепи C31, и увеличилось примерно в 4 раза количество 9,13,21-триметилтриакоктана. Между углеводородными профилями самок и самцов значительных отличий не наблюдалось.

Среди полярных компонентов в эпикуткуле *S. gregaria* так же, как и в азиатской саранче было идентифицировано четыре класса липидов: воска, свободные жирные кислоты, свободные спирты и триглицериды [137]. Основными жирными кислотами в составе восков являлись 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, общее содержание было не выше 7%. Содержание короткоцепочечных кислот C10,C12 было выше, чем в азиатской саранче, а кислот C18:0 и

C20:0 – ниже. Содержание ненасыщенных жирных кислот было значительно ниже по сравнению с азиатской саранчой. Основными первичными спиртами в составе восков были C16, C17, C18, C22. Содержание спирта C17 было значительно выше, а C14 и C21 ниже, чем у *L. migratoria*. Основными идентифицированными свободными жирными кислотами *S. gregaria* были 14:0, 16:0, 18:0, их общее содержание не превышало 5%. Ненасыщенных свободных жирных кислот было значительно меньше, чем у *L. migratoria*. Среди свободных первичных спиртов доминировали спирты с четным углеродным числом, как и в азиатской саранче, однако у пустынной саранчи основным спиртом был пентадеканол C15. Содержание триглицеридов в эпикутикуле *S. gregaria* составляло 65.7% и 64.8% у самцов и самок, соответственно, что выше, чем у *L. migratoria*. Спектр связанных кислот *S. gregaria* в триглицеридах был уже, чем у *L. migratoria*: C10-C18 у самок и у самцов C14-C18. Наиболее интенсивные идентифицированные кислоты 14:0, 16:0 и 18:0. Ненасыщенных кислот в составе триглицеридов обнаружено не было.

С точки зрения восприимчивости разных видов саранчовых к грибным инфекциям отмечены следующие тенденции. Ксерофильные виды менее устойчивы к действию патогенов по сравнению с мезо- и гигрофильными видами [20]. Например, смертность имаго пустынного пруса *Calliptamus barbarus* от *M. robertsii* составляла 100% уже через 5-8 дней, тогда как 100% смертность для *L. migratoria* только через 17 суток. Аналогично, уровень смертности личинок *L. migratoria* на 4-й день был в 2-3 раза ниже по сравнению с личинками пустынной саранчи *S. gregaria* при заражении тремя видами энтомопатогенных грибов: *M. robertsii*, *B. bassiana* и *B. brongniartii* [20, 142]. Но как связаны различия в восприимчивости к патогенам у саранчовых из разных гигротермических станций с композициями кутикулярных липидов – неизвестно.

1.2. Метод ГХ/МС для исследования эпикутикулярных липидов насекомых

Метод хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) является основным при анализе объектов окружающей среды природного происхождения. Основными задачами в данной области являются идентификация соединений, объектов и процессов. Одно из главных преимуществ метода – универсальность масс-спектрометрического детектора ко всем классам органических веществ. С помощью газового хроматографа удастся разделить компоненты образца и определить их количество, а с помощью масс-селективного детектора – идентифицировать их за счет ионизации, фрагментации, разделении ионов и получении масс-спектра. Одной из особенностей природных объектов является их многокомпонентность. В связи с этим процессы выделения и концентрирования индивидуальных соединений значительно усложняют экспериментальную задачу. Методы и режимы, применяемые в ГХ/МС анализе, позволяют решить данные проблемы: метод масс-хроматографии, масс-фрагментации и анализ хроматографических профилей природных объектов.

Хроматографические профили ("отпечатки пальцев", fingerprint) природного объекта являются идентификационными или диагностическими характеристиками при исследовании природных объектов и процессов, протекающих в природных объектах, что позволяет идентифицировать соединения, процессы и объекты [143]. Метод масс-хроматографии (режим SCAN) используется для обзорного анализа и включает в себя хроматографирование в режиме полного ионного тока и процедуру "ионной экстракции". В последнем случае целевые профили получаются вследствие реконструкции исходной хроматограммы по характеристическим ионам целевых соединений. Метод масс-фрагментографии заключается в хроматографировании в режиме селективного детектирования индивидуальных ионов (Selected ion monitoring – SIM). Данный метод применяется для целевого анализа микропримесей в сложных матрицах [143].

Эпикутикулярные углеводороды насекомых представляют собой сложную, многокомпонентную смесь близких по строению и физико-химическим свойствам соединений. Особое многообразие представляют собой метилразветвленные углеводороды; в кутикуле насекомых встречаются моно-, ди-, три-, тетра- и даже пента-метилзамещенные алканы с разным положением метильных групп в молекуле. Проблема определения состава и химического строения эпикутикулярных углеводородов осложняется еще и отсутствием данных по метилразветвленным углеводородам в стандартных масс-спектральных библиотеках. Для установления химического строения изомеров метилразветвленных углеводородов Нельсон и соавторы предложили следующий алгоритм [6], включающий: 1) расчет индексов удерживания идентифицируемого углеводорода; 2) анализ и выявление характеристических ионов в масс-спектрах, получающихся вследствие распада углеводорода; 3) проверку предполагаемой структуры на «биохимическую осуществимость».

1.2.1. Использование индексов удерживания при анализе кутикулярных углеводородов

Время удерживания (или связанная с ним величина – индекс удерживания) является первой идентификационной характеристикой вещества, помимо этого индексы удерживания обладают высокой межлабораторной воспроизводимостью. Индексы удерживания выражают в системе координат, задаваемой реперными *n*-алканами. При анализе природных объектов используют две основные системы индексов удерживания: индексы удерживания Ковача (ИК) и линейные индексы удерживания (ЛИУ). Данные величины индексов удерживания различаются, и их расчет определяется температурным режимом хроматографирования. Помимо этого значения индексов удерживания зависят от типа неподвижной фазы. Индексы удерживания Ковача, используемые при изотермическом режиме хроматографирования, рассчитываются путем логарифмической анаморфозы исправленных времен удерживания (*I*) [122]:

$$I_x = I_n + 100k \frac{\lg t'_{Rx} - \lg t'_{Rn}}{\lg t'_{R(n+k)} - \lg t'_{Rn}}, \quad (1)$$

где $I_n = 100n$ – индекс удерживания n -алкана, содержащего в молекуле n атомов углерода, t'_{Rx} – приведенное время удерживания исследуемого компонента, t'_{Rn} и $t'_{R(n+k)}$ – приведенные времена удерживания ближайших реперных n -алканов с числом атомов углерода n и $n+k$ соответственно, причем обычно $t'_{Rn} < t'_{Rx} < t'_{R(n+k)}$.

В условиях линейного программирования температуры, которые обычно используются при анализе многокомпонентных смесей, времена удерживания гомологов увеличиваются линейно с увеличением числа атомов углерода в молекулах. Вследствие этого становится возможным использовать линейную интерполяцию и абсолютные времена удерживания. Линейные индексы удерживания по формуле (2) [122]:

$$J_x = J_n + 100k \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{R(n+k)} - t_{Rn}}, \quad (2)$$

где J_n – индекс удерживания n -алкана, содержащего в молекуле n атомов углерода, t'_{Rx} – абсолютное время удерживания исследуемого компонента, t'_{Rn} и $t'_{R(n+k)}$ – абсолютные времена удерживания ближайших реперных n -алканов с числом атомов углерода n и $n+k$ соответственно.

Следует отметить, что линейные индексы удерживания зависят от режима программирования температуры [122,144], и это необходимо учитывать при сравнении литературных и экспериментальных данных.

У углеводов с метильными разветвлениями значения индексов удерживания всегда меньше индексов удерживания n -алканов с такой же молекулярной массой. Существуют следующие общие закономерности между значениями ИУ и количеством метильных групп у углеводов: так, монометилалканы с боковой цепью с 33 атомами углерода (брутто С34) имеют значения ИК в области 3328-3374, диметилалканы с той же длиной цепи (брутто С35) – 3340-3410, триметилалканы (брутто С36) – 3378-3437 [145]. Разброс значений индексов определяется разным положением метильных групп вдоль главной цепи. Так, при продвижении метильной группы к центру углеродной цепи значения ИУ уменьшается, а при продвижении к концу цепи – увеличиваются; данная закономерность характерна как для моно-, так и для ди- и триметилразветвленных алканов. В таблице 1.1 приведены значения ИУ для разных изомеров метилразветвленных алканов, идентифицированных в эпикутикуле насекомых [6,146].

Таблица 1.1. Рассчитанные значения ЛИУ кутикулярных метилразветвленных углеводов из паразитических ос *Dibrachys cavus* [146] и ИК кутикулярных метилразветвленных углеводов колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* [6]

Длина главной цепи	Положение метильной группы в цепи						
	<i>Dibrachys cavus</i> , монометилалканы						
	3-метил	5-метил	7-метил	9-метил	11-метил	13-метил	15-метил

C25	2573	2551	-	-	-	-	-
C27	2773	2751	2742	2737	2733		-
C29	2973	2951	2941	2936	2933	2932	2931
C31	3172	3148	3138	3133	3130	3129	3128
C33	-	-	3338	-	3330	3328	3327
C35	-	-	-	-	-	3526	
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>							
	Внутренне разветвленные диметилалканы			Терминально разветвленные диметилалканы			триметилалканы
	11,17- диметил	12,18- диметил	10,18- диметил	2,6- диметил	2,10- диметил	2,17- диметил	2,10,18- триметил
C26	-	-	-	2709	-	-	-
C27	2770	-	-	-	-	2797	-
C28	-	-	2873	2905	2899	-	2925
C29	-	-	-	-	-	2997	-
C30	-	-	-	3104	3095	-	3123
C31	3160	-	-	-	-	-	-
C32	-	3261	-	3298		-	-
C33	3362	-	-	-	-	3398	-
C34	-	3461		-	3497	-	3524
C35	3560	-	-	-	-	-	-
C36	-	3666		-	3700	-	3722

Как видно из приведенных данных, наблюдаются закономерности в величинах индексов удерживания для изомеров моно-, ди- и триметилразветвленных алканов. Т.о. исходя из значения ИУ можно предварительно сделать заключение о молекулярной массе, количестве и положении метильных групп в молекуле.

Следует отметить, что разделение и установление химического строения близких по физико-химическим свойствам изомеров метилразветвленных углеводородов представляется сложной задачей.

1.2.2. Анализ масс-спектров при идентификации метилразветвленных углеводородов

Масс-спектр – уникальная характеристика вещества, содержащая информацию о характеристических ионах данного соединения и отражающая его структурные особенности. Анализ метилразветвленных углеводородов осложняется еще и тем, что в библиотеках масс-спектральных данных их практически нет.

Характерной особенностью масс-спектров *n*-алканов является присутствие пиков гомологических ионов состава $C_nH_{2n+1}^+$, отличающихся на 14 единиц m/z , интенсивности которых убывают в ряду $C_3H_7^+$ (m/z 43) > $C_4H_9^+$ (m/z 57) > $C_5H_{11}^+$ (m/z 71) > $C_6H_{13}^+$ (m/z 85) и т.д. (так называемый «ski-slope» – «лыжный трамплин») (рис. 1.9) [147]. В масс-спектрах предельных линейных углеводородов наблюдается молекулярный ион M^+ , который представляет собой катион-радикал с нечетным количеством электронов, образующийся при выбивании электрона из молекулы и позволяющий определить молекулярную массу и брутто-

формулу вещества. Молекулярный ион алканов способен распадаться на карбокатион и радикал, заряд при этом преимущественно остается на меньшем фрагменте.

Если в молекуле алкана появляется метильная группа, то в масс-спектре повышаются интенсивности ионов с m/z $M-15$, соответствующие отрыву метильной группы, и появляются более интенсивные характеристические ионы, соответствующие разрыву связей С-С в местах разветвления цепи и обладающие более высокой устойчивостью (рис. 1.10). По набору характеристических ионов можно установить структуру вещества [147,148]. В случае монозамещенных алканов наблюдается 2 пары характеристических ионов, так как разрывы С-С связей могут происходить по обеим сторонам от точки разветвления, в случае диметилзамещенных алканов возможны 4 пары характеристических ионов. Однако в случае симметричного строения молекулы при распаде образуются одинаковые фрагменты, и в масс-спектре наблюдаются одна пара характеристических ионов (монометилзамещенный) или два характеристических иона (диметилзамещенный) [147].

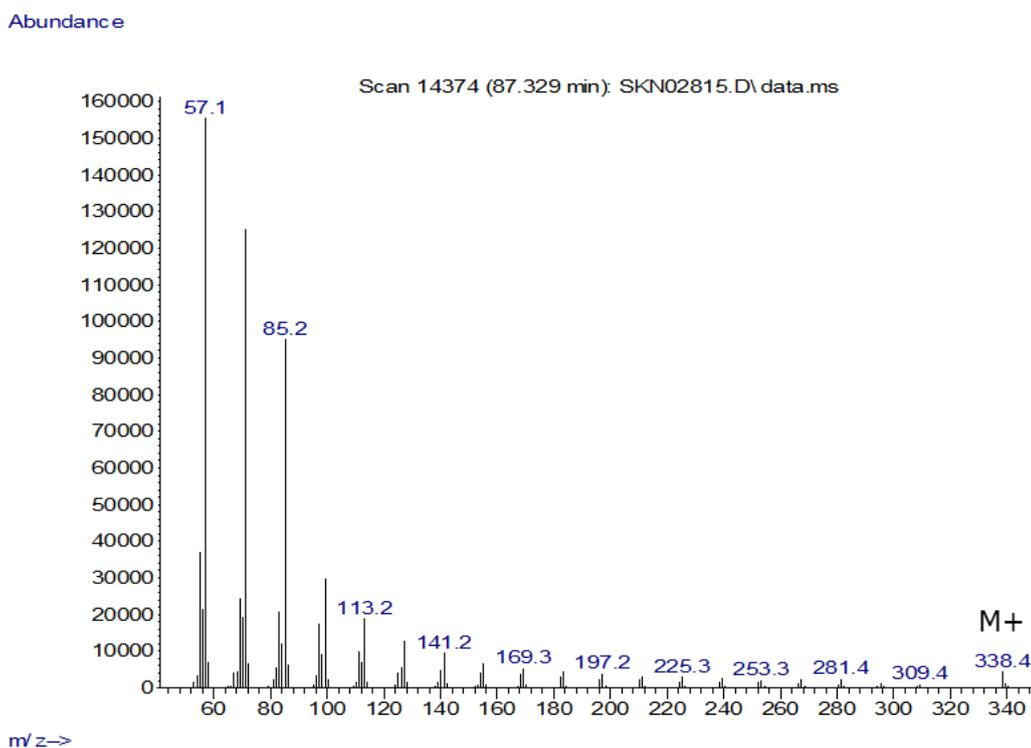


Рис. 1.9. Пример масс-спектра n -алкана (n - $C_{24}H_{50}$)

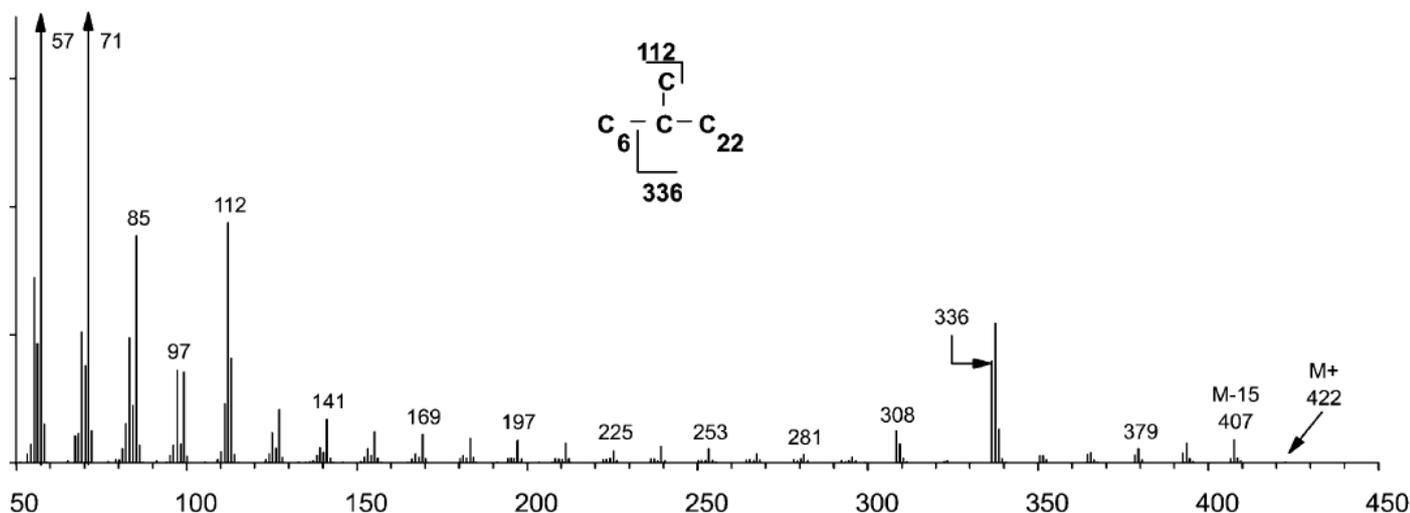


Рис. 1.10. Пример масс-спектра монометилразветвленного алкана (7-метилнонакан) и схема распада для него [149]

Если в диметилзамещенном алкане одна метильная группа находится во 2-м положении, то в масс-спектре будут наблюдаться только два характеристичных иона, соответствующие распаду в середине цепи: распады во 2-м положении приведут к иону M-15 (который и так является характерным для всех метилразветвленных углеводородов) и иону с m/z 43 (рис. 1.11) [147].

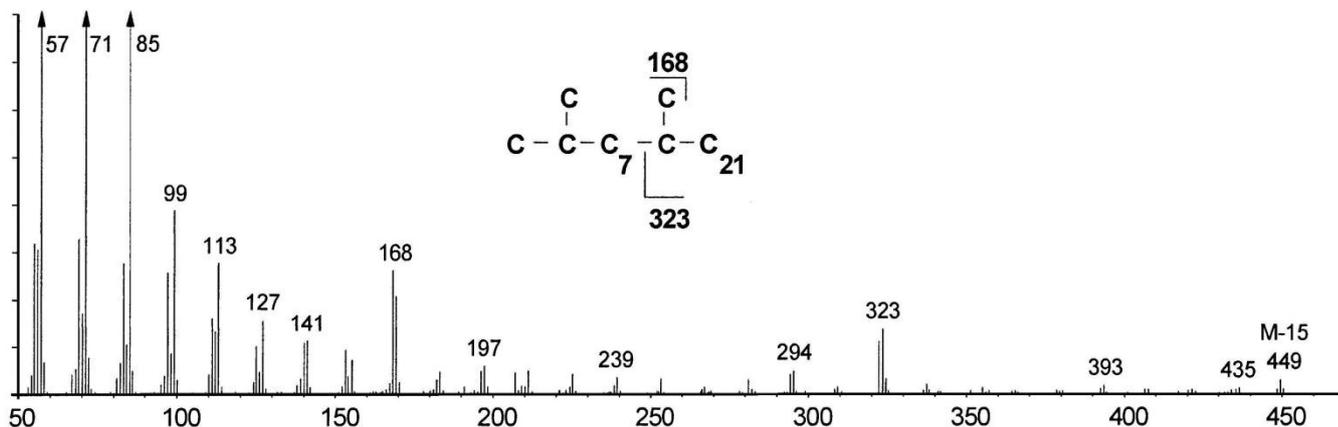


Рис. 1.11. Пример масс-спектра диметилразветвленного алкана с разветвлением во 2-м положении и схема распада для него [6]

В масс-спектрах метилразветвленных алканов помимо нечетных характеристичных ионов C_nH_{2n+1} также могут наблюдаться ионы C_nH_{2n} с четным m/z . Данные ионы формируются вследствие отщепления водорода от различных фрагментарных ионов или молекулярного иона и могут иметь разную интенсивность (рис. 1.12).

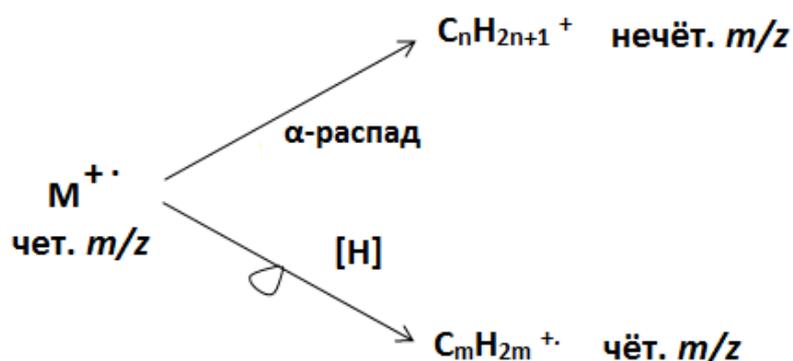


Рис. 1.12. Возможные пути распада молекулярного иона метилразветвленного углеводорода

Интенсивности данных ионов зависят от количества метильных групп в молекуле [150]. Так, в случае монометилалканов интенсивность иона с четным m/z (C_nH_{2n}) обычно выше, чем интенсивность иона без отрыва H (C_nH_{2n+1}). В случае диметилалканов интенсивности ионов C_nH_{2n+1} и C_nH_{2n} примерно одинаковы. В качестве примера на рис. 1.13 и 1.14 приведены масс-спектры метилразветвленных алканов с разными интенсивностями четных и нечетных ионов. Эту закономерность, помимо различия в величинах индексов удерживания, можно использовать для отличия монометилалканов от симметричных диметилалканов.

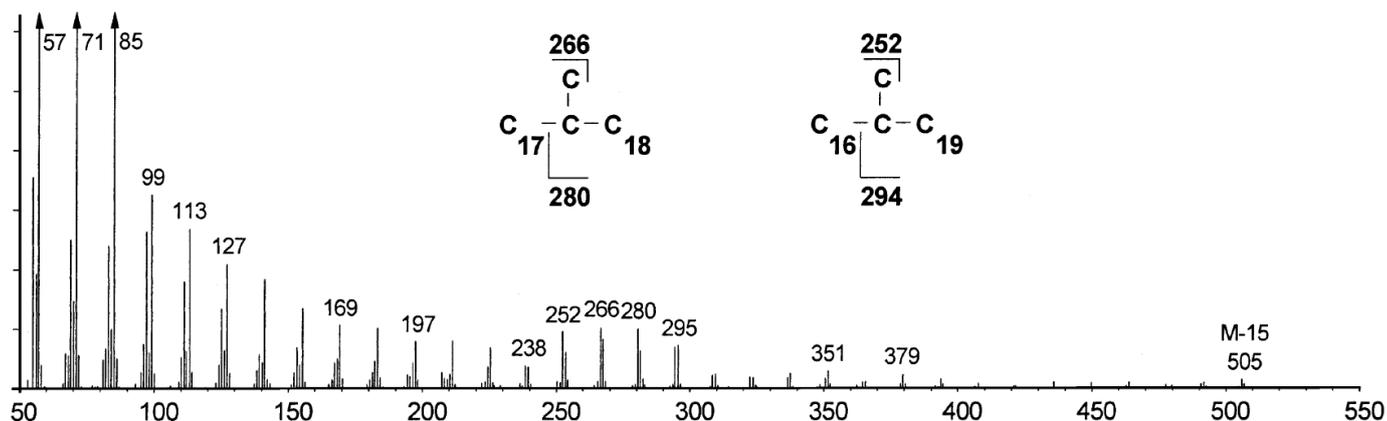


Рис. 1.13. Пример масс-спектра монометилалканов (18- и 17-метилгексатриаконтаны) из [6], интенсивность четных ионов выше (m/z 252 и 280)

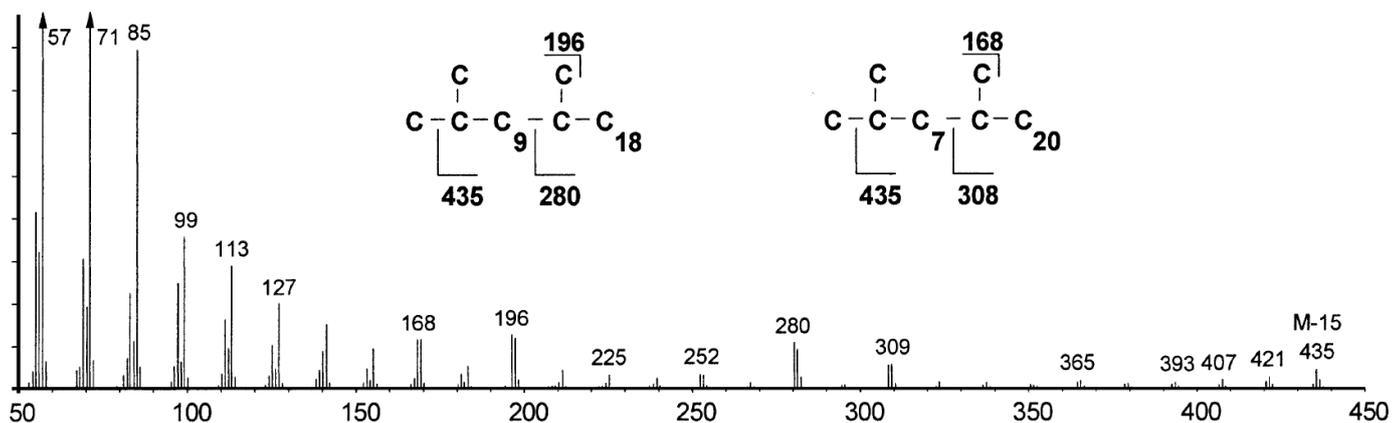


Рис. 1.14. Пример масс-спектра диметилалканов (2,12- и 2,10-диметилтриаконтаны) из [6], интенсивности четных и нечетных ионов одинаковы

Еще один подход к идентификации метилразветвленных углеводов насекомых заключается в разработке схем встречного синтеза предполагаемых соединений с дальнейшим анализом их масс-спектров и расчетом индексов удерживания. Примеры таких встречных синтезов даны в [151,152] (рис. 1.15).

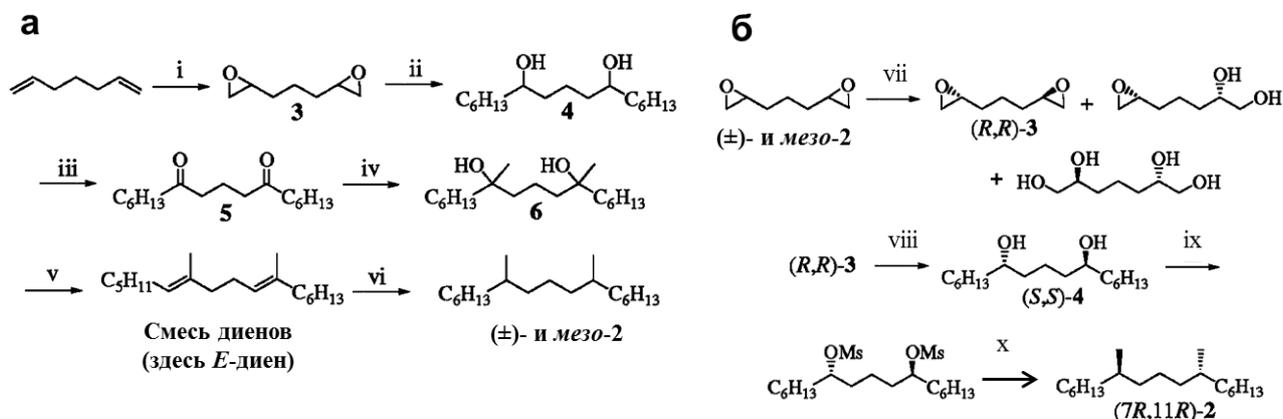


Рис. 1.15. Пример общей (а) и стереоселективной (б) схемы синтеза 7,11-диметилгептана из [125]. (i) *m*-CPBA, DCM; (ii) *n*-пентилMgBr, CuI, диэтиловый эфир; (iii) реагент Джонса; (iv) MeMgI, диэтиловый эфир; (v) ДМСО; (vi) H₂, Pd/C; (vii) [(*R,R*)-salenCo^{III}OAc], H₂O; (viii) *n*-пентилMgBr, CuI; (ix) MsCl, Et₃N; (x) Me₂CuLi, диэтиловый эфир

1.2.3. Биохимически осуществимые пути синтеза метилразветвленных углеводов насекомых

Метилразветвленные углеводороды синтезируются в организме насекомых по определенным биохимическим путям, и, следовательно, существуют ограничения на количество и положение метильных групп в молекуле углеводорода. Впервые попытка описать закономерности строения метилразветвленных алканов насекомых на основании биосинтетических путей была предпринята Нельсоном и соавторами [6], и этот подход был назван «биохимической осуществимостью». Во внутренне разветвленных монометилалканах (X-метилалканы, X ≠ 2) до точки разветвления может быть как четное, так и нечетное число атомов углерода, так как синтез может начинаться с ацетила-СоА или пропионила-СоА [6]. Прирост цепи идет двууглеродными частицами, но при декарбоксилировании отщепляется одна углеродная единица, еще одна единица остается в главной цепи из предыдущего разветвления – из метилмалонил-СоА: итога в концевой части молекулы будет 2N+1+1, т.е. четное число атомов углерода. Для диметилалканов (X,Y-диметилалканы, внутреннее замещение, X,Y ≠ 2) появляется такой критерий, как количество атомов углерода между метильными группами. В связи с тем, что прирост линейной части цепи идет двууглеродными частицами, а еще один углерод из предыдущего фрагмента метилмалонил-СоА, между метильными группами в середине молекулы может быть только 2N+1, т.е. нечетное число атомов углерода [153-156].

По отдельному механизму синтезируются 2-метилалканы (терминально разветвленные). Исходным веществом для них может выступать аминокислота валин или лейцин, т.е. число

атомов углерода во всей цепи может быть четным (в случае валина) и нечетным (в случае лейцина). Последняя карбоксильная группа уходит при декарбоксиировании. Для терминально разветвленных диметилалканов (2,X-диметилалканы) количество атомов углерода между метильными группами может быть либо четным (лейцин), либо нечетным (валин) [155-157]. Таким образом, «биохимические правила» построения метилразветвленных алканов можно сформулировать в следующем виде:

1. В линейной части цепи после последней метильной группы должно быть **четное** число атомов углерода;
2. Если метильные группы находятся в середине цепи, между ними должно быть **нечетное** число атомов углерода;
3. В случае 2,X-диметилалканов допустимо как **четное**, так и **нечетное** число атомов углерода между метильными группами.

Биохимическая осуществимость используется как критерий для идентификации при анализе методом ГХ/МС: в некоторых случаях разные структуры при распаде образуют одинаковый набор ионов и имеют одинаковые индексы удерживания, но не все структуры могут быть биохимически осуществимы. Например, в работе [158] приводится идентификация кутикулярных метилразветвленных углеводов колорадского жука. Для некоторых пиков имеется две структуры, отвечающие одинаковому распаду (таблица 1.2).

Таблица 1.2. Примеры идентифицированных кутикулярных углеводов колорадского жука из [156]

Индекс удерживания	Структура
2704	2,6- и/или 7,20-диметилгексакозан
2899	2,18- и/или 11,18-диметилоктакозан
2905	2,6- и/или 7,22-диметилоктакозан
3105	2,6- и/или 7,24-диметилтриаконтан

Но один из изомеров в приведенных структурах не отвечал биохимическим правилам – между метильными группами было четное число атомов углерода (рис. 1.16). Следовательно, это биохимически невозможная структура.

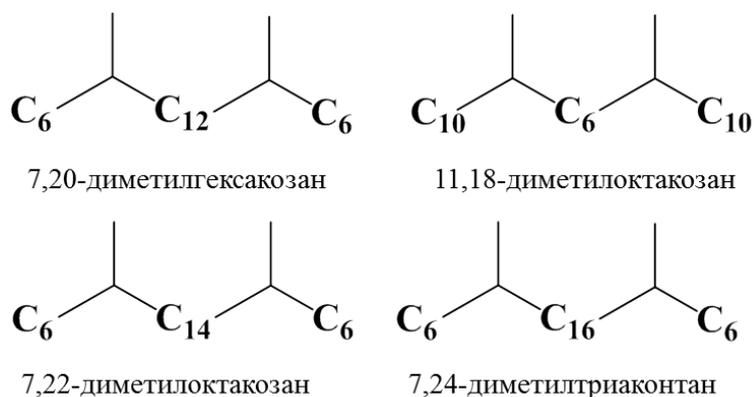


Рис. 1.16. Структуры, несоответствующие правилам биосинтеза

1.3. Заключение по литературному обзору

Как следует из анализа литературных данных, состав эпикутикулы определяет механизмы взаимодействия насекомых с абиотическими и биотическими факторами окружающей среды в процессе онтогенеза. Эпикутикула предотвращает потерю воды, участвует в химической коммуникации, влияет на протекание грибных инфекций. Основным высокоинформативным и надежным инструментом для анализа липидной композиции эпикутикулы насекомых является метод хромато-масс-спектрометрии. Анализ индексов удерживания, характеристических ионов в масс-спектре и путей биосинтеза позволяют надежно установить состав и химическое строение метилразветвленных алканов из многокомпонентных смесей в эпикутикуле. Следует отметить, что в случае сложных смесей метилразветвленных углеводов и их недостаточного хроматографического разделения могут возникнуть проблемы выявления характеристических ионов в масс-спектрах.

Несмотря на широкие исследования по составу кутикулярных липидов разных видов насекомых на разных стадиях онтогенеза и с разной восприимчивостью к патогенам, ряд вопросов остается нераскрытым.

Саранчовые и колорадский жук являются опасными вредителями сельского хозяйства. Использование энтомопатогенных грибов, проникающих через кутикулу, является перспективным подходом в борьбе с насекомыми-вредителями. В литературе есть работы по анализу эпикутикулярных липидов имаго и яиц колорадского жука, но в то же время нет примеров анализа эпикутикулярных липидов личинок и куколок колорадского жука и сравнительного анализа состава эпикутикулы на разных фазах развития (личинки разных возрастов, куколки, имаго) и их различие в восприимчивости к патогенам. Также непонятно как энтомопатогенные грибы утилизируют кутикулярные липиды колорадского жука при развитии инфекции. В литературе есть ряд работ по исследованию состава кутикулярных липидов мезоксерофильной азиатской саранчи, но нет работ по исследованию состава кутикулярных липидов ксерофильного итальянского пруса. Помимо этого неизучена связь между различиями в восприимчивости к грибным инфекциям у стадных саранчовых с разными гигротермическими преференциями с различиями в составе кутикулярных липидов.

Между тем исследовать данные вопросы необходимо как для понимания фундаментальных механизмов компромисса функций эпикутикулы, так и для разработки подходов в контроле численности сельскохозяйственных вредителей.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Реактивы и материалы

В работе были использованы следующие реактивы и растворители: *n*-гексан, петролейный эфир, диэтиловый эфир, метил-третбутиловый эфир, дихлорметан, хлороформ, метиловый спирт, перекись водорода, серная кислота, гидроксид калия, сульфат магния, соляная кислота (ООО «АО Сибреахим», ООО «ТД Химмед», ООО НПП «Гамма», АО «Экос-1», ООО «Сигматек», ООО «Уфа-хим»), Твин-20 (Croda Inc., США), агароза (MP Biomedicals, США), *n*-тетракозан (Acros Organics, США), *n*-дотриаконтан (Acros Organics, США), метилстеарат (Acros Organics, США), стандартный образец *n*-алканов HP 5080-8716 состава C5-C40 (Agilent Technologies, США), смесь *n*-алканов состава C24-C41 из нефтяного парафина П-2 (ПАО «Лукойл»). Растворители перед использованием перегоняли. Диазометан получали согласно [85] из *N*-нитрозометилмочевины, которая была любезно предоставлена к.х.н. Черняк Е. И. (НИОХ СО РАН).

В работе были использованы штаммы гриба *Metarhizium robertsii* P-72 (Genbank # KP172147.2) и Мак-1 (Genbank # KP172145) из коллекции микроорганизмов Института Систематики и Экологии Животных СО РАН.

2.2. Насекомые

Личинки колорадского жука собирались в Карасукском районе Новосибирской области на частных картофельных полях в середине июля и далее выращивались в лаборатории до нужного возраста или стадии. Личинки помещались в 300-мл пластиковые вентилируемые контейнеры (10 насекомых на 1 контейнер) при 25°C и относительной влажности 20-30% с фотопериодом 16/8 ч. В качестве корма использованы листья картофеля. В экспериментах использованы личинки колорадского жука трех возрастных групп в пределах последнего IV возраста: свежеперелинявшие (4-6 ч после линьки), личинки промежуточной стадии (34-36 ч после линьки) и личинки, заканчивающие питание (84-86 ч после линьки) (рис. 2.1). В эксперименте с разными стадиями онтогенеза (личинки-куколки-имаго) использовались свежеперелинявшие личинки IV возраста, куколки 3-дневного возраста и имаго обоих полов (рис. 2.2).



Рис. 2.1. Личинки колорадского жука IV возраста через 4-6 ч, 34-36 ч и 84-86 ч после линьки

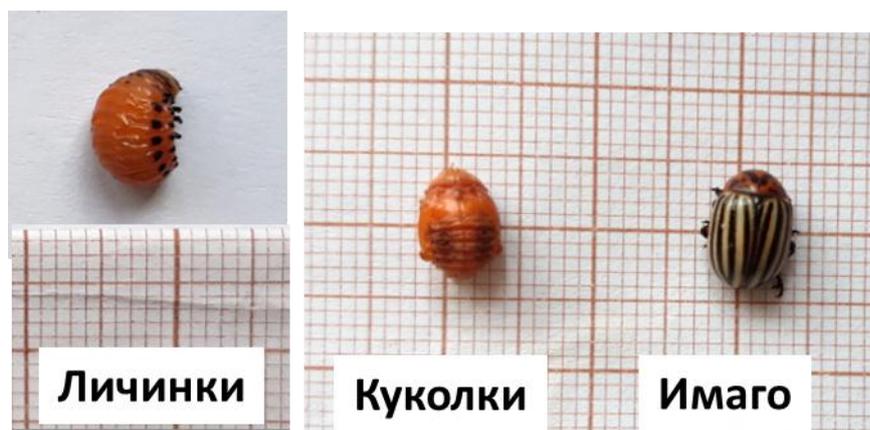


Рис. 2.2. Три фазы колорадского жука, используемые в экспериментах

Нимфы саранчовых третьего возраста собирались в естественных станциях в Юго-Восточном Казахстане (Алматинская область) в мае 2019 года. Места сбора: перелетная саранча (*Locusta migratoria migratoria*) – 45.385162°N, 75.249230°E, итальянский прус (*Calliptamus italicus*) – 43.518412°N, 76.830550°E. Нимф собирали энтомологическим сачком в садки из металлической сетки 80×80 см и доставляли в лабораторию в течение одних суток. Насекомых содержали в литровых вентилируемых пластиковых контейнерах (10 личинок на 1 контейнер) при 24°C и фотопериоде 16:8 (свет:темнота). В качестве корма использована смесь тростника и осок для *L. migratoria*, и смесь видов *Artemisia* для *C. italicus*. Фотографии насекомых приведены на рис. 2.3.

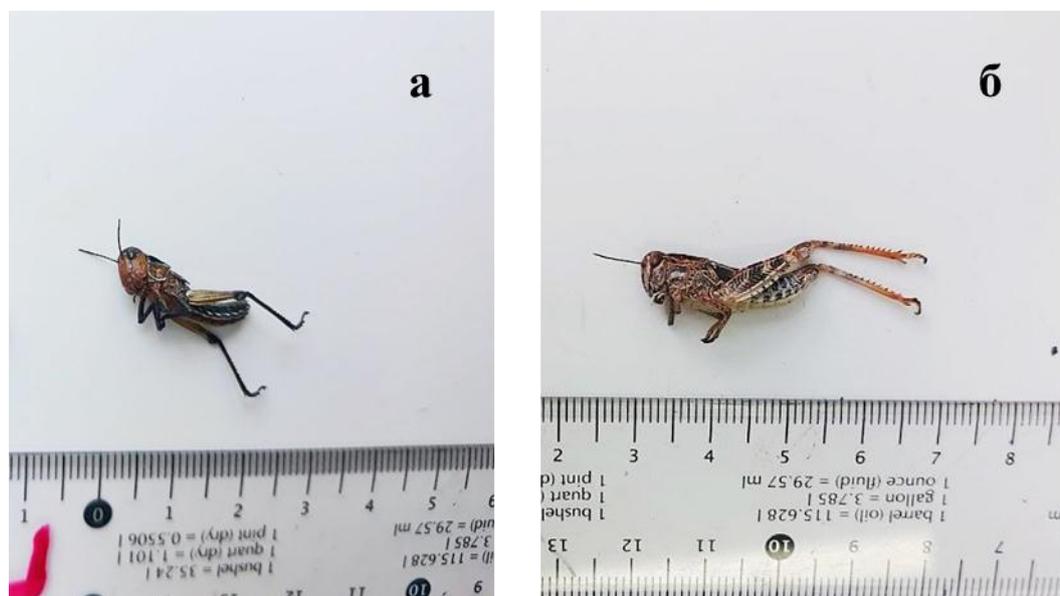


Рис. 2.3. Нимфы III возраста азиатской саранчи (а) и итальянского пруса (б)

2.3. Восприимчивость к грибной инфекции *M. robertsii*

Для определения уровня смертности и адгезии личинок колорадского жука и саранчовых использовали штамм *Metarhizium robertsii* P-72. Конидии были культивированы на дважды

автоклавированном пшене, высушены при комнатной температуре в течение 10 суток и просеяны через почвенное сито. Конидии суспензировали в водно-твинном растворе (Твин-20, 0.03%) и концентрацию подсчитывали в стандартном гемоцитомитре. Уровень прорастания конидий на агаре Сабуро составлял не менее 95%.

Для анализа динамики смертности использовали концентрацию гриба 10^7 конидий/мл для саранчовых и 10^6 конидий/мл для личинок колорадского жука. Насекомых погружали на 10 сек в суспензию конидий или в водно-твинный раствор (контроль). После инокуляции насекомых содержали в литровых вентилируемых пластиковых контейнерах (10 личинок на 1 контейнер) при 24°C и фотопериоде 16:8 (свет:темнота). Кормление и учет смертности проводили ежедневно в течение 12 суток. Тестирования проведены в 4-х повторностях (1 повторность – 10 личинок) и все эксперименты независимо повторены трижды.

2.4. Уровень адгезии и прорастания *M. robertsii*

Для анализа уровня адгезии использована модифицированная методика Мент и соавторов [24]. Личинок колорадского жука трех возрастов и саранчовых погружали в водно-твинные суспензии грибов (10^8 конидий/мл) на 10 сек. Через 6 часов насекомых вортексировали 1 мин при 500 об/мин в водно-твинном растворе (Твин-20, 0.05%), чтобы смыть неадгезировавшие конидии. Затем 2 личинки (колорадский жук) или 4 личинки (саранчовые) помещали в 10-миллилитровую виалу с 5 мл дихлорметана и встряхивали 5 мин при 200 об/мин. Насекомых извлекали из виал, дихлорметан упаривали досуха. Затем осадок ресуспендировали в 1 мл (для колорадского жука) или 2 мл (для саранчовых) водно-твинного раствора при 3000 об/мин в течение 5 мин. Затем концентрацию конидий подсчитывали в гемоцитометре. Для личинок колорадского жука результаты пересчитывали на площадь поверхности, для саранчовых – на одну личинку. Для анализа использовано 8 повторностей (1 повторность = 4 личинки) для каждого вида саранчовых и 9 повторностей (1 повторность = 2 личинки) для личинок колорадского жука.

Для определения уровня прорастания конидий экстракты эпикутикулы колорадского жука (*n*-гексан:метилтрет-бутиловый эфир 1:1) были нанесены на поверхность агарозы в чашки Петри [108] из расчета экстракт с одной личинки на 1^2 см агарозы. Контрольные площадки обрабатывались смесью растворителей. Затем на площадки была нанесена суспензия конидий *M. robertsii* (20 мкл, 10^6 конидий/мл) и высушена под потоком ламинарного воздуха в течение 20 мин. Чашки инкубировали при 26°C в течение 16 часов, после чего подсчитывали число проросших и непроросших конидий с использованием световой микроскопии. Три повторности (10 полей зрения в каждой) было использовано в каждой обработке. Аналогичным способом с минорными модификациями [159] определяли прорастание конидий на эпикутикулярных экстрактах саранчовых.

2.5. Заражение личинок колорадского жука для анализа липидного состава насекомых до и после колонизации грибом

Для сравнения липидной композиции живых и колонизированных грибом личинок колорадского жука использовали штамм *M. robertsii* Mak-1, активно колонизирующий личинок жука и образующий конидиальное спороношение на поверхности погибших насекомых [160]. В качестве искусственной питательной среды (ИПС) для грибов использовали дважды автоклавированное пшено [108]. Насекомых заражали путем погружения в водно-твинную (0.03%) суспензию с титром $2 \cdot 10^6$ конидий/мл. Контрольные насекомые обрабатывались водно-твинным раствором без конидий грибов. Через 9-12 суток после заражения погибших насекомых раскладывали по влажным камерам на 4-5 суток для получения конидиального спороношения. Конидиальный слой был смыт водой, насекомые высушены на фильтровальной бумаге при 25°C в течение 30 минут. Живые (контрольные) личинки также были обработаны водой и высушены. Затем насекомые были заморожены при -20°C до экстракции. 4 повторности (1 повторность = 40 личинок) использовано в каждом варианте эксперимента.

Смытые конидии были высушены на фильтровальной бумаге в течение 2 суток при комнатной температуре. Конидии, выращенные на пшене аналогичным образом, обрабатывались водой и сушились на фильтровальной бумаге. Оба типа конидий (выращенные на пшене и на насекомых) были заморожены на -20° до проведения экстракции. 4 повторности (1 повторность = 0.2 г конидий) использовано в каждом варианте эксперимента.

Для анализа изменений состава эпикутикулярных липидов личинок колорадского жука после их колонизации грибом использовались личинные шкурки личинок IV-го возраста. Перед тестированием шкурки обрабатывались 6% раствором перекиси водорода в течение 2 мин и затем промывались дистиллированной водой для минимизации влияния бактерий на изменение химического состава липидов. Шкурки были погружены в водную суспензию *M. robertsii* с концентрацией $2 \cdot 10^8$ конидий/мл на 15 сек и затем помещены на предметные стекла во влажные камеры. Инкубация проводилась 5 суток при температуре 24°C в темноте. После инкубации шкурки замораживались при -20°C. Для получения контрольных образцов шкурок проводились аналогичные процедуры, но обработка проводилась водой без конидий гриба. Для анализа использовано 4 повторности каждого варианта (1 повторность = 80 шкурок).

2.6. Влияние кутикулярных липидов колорадского жука на вирулентность гриба *M. robertsii*

Для изучения влияния кутикулярных липидов на вирулентность гриба был проведен смыв поверхностных липидов личинок IV возраста (36-40 ч после линьки) смесью *n*-гексан : метилтрет-бутиловый эфир (1:1) с последующим выпариванием растворителей. Затем 1 мл экстракта наносили равномерно на поверхность картофельного агара в чашки Петри из расчета

экстракт с одного насекомого на 1 см^2 поверхности среды, то есть экстракт с 63 насекомых на одну чашку Перти площадью 63 см^2 . В контрольном варианте на поверхность среды наносили смесь чистых растворителей. Посев *M. robertsii* осуществляли с помощью микробиологической петли с последующим распределением шпателем по всей поверхности (газонный посев). Культуры инкубировали 10 суток при 26°C , после чего конидии собирали шпателем и суспендировали в водно-твинном (0.03%) растворе. Концентрации выравнивали до $5 \cdot 10^6$ конидий/мл с помощью стандартных гемоцитометров. Личинок начала IV возраста погружали в суспензии как указано выше. Контрольные варианты (без заражения) обрабатывали водно-твинным раствором. Контейнеры с насекомыми инкубировали при 30°C , смертность учитывали ежедневно в течение 9 суток. Использовано 10 повторностей, по 10 личинок в каждой.

2.7. Получение образцов кутикулярных липидов

Для получения смывов эпикутикулярного слоя колорадского жука на разных стадиях онтогенеза и нимф саранчовых использовали общепринятую методику получения поверхностных липидов членистоногих [21,24]. Предварительно насекомые помещались в 3-литровые стеклянные банки с фильтровальной бумагой (80 особей на банку) и усыплялись хлороформом в течение 5 мин для минимизации попадания регургитата и фекалий в экстракт. Для личинок колорадского жука разных возрастов предварительно определяли площадь поверхности кутикулы: расправленная кутикула личинок помещалась на палетку, площадь измерялась с помощью миллиметровой бумаги, для каждой возрастной группы проводилось 3 измерения (табл. 2.1).

Для колорадского жука смыв проводился смесью *n*-гексан : метилтрет-бутиловый эфир (1:1 v/v), для саранчовых – *n*-гексан : диэтиловый эфир (1:1 v/v). Насекомых помещали в 100-миллилитровые стеклянные банки, заливали смесью растворителей (52 мл для саранчовых, 56 мл для куколок колорадского жука, 35 мл для имаго колорадского жука). Объем растворителей для личинок колорадского жука IV возраста варьировался в зависимости от площади поверхности (табл. 2.1). Растворители с насекомыми перемешивали в течение 5 мин при 160 rpm при 28°C . Затем смывы были перемещены в виалы, доупарены на вакуумном испарителе (Eppendorf, Германия), взвешены и сохранены на -20°C до анализа. Для личинок колорадского жука на разных стадиях IV возраста использовали 5 повторностей для свежеперелинявших и промежуточных личинок и 6 повторностей для заканчивающих питание личинок (1 повторность = 80 личинок). В эксперименте с личинками, куколками и имаго колорадского жука использовали от 4 до 6 повторностей (1 повторность = 80 насекомых для личинок и куколок, 1 повторность = 40 насекомых для имаго). Для саранчовых использовали 6 повторностей (1 повторность = 80 насекомых).

В эксперименте с патогенезом личинок колорадского жука для получения экстрактов целого тела личинок, личинных шкур и грибов личинки, шкурки и конидии грибов замачивались в смеси растворителей *n*-гексан : метилтрет-бутиловый эфир (1:1 v/v) при комнатной температуре на 24 ч и подвергались ультразвуковой обработке в течение 30 мин. Затем конидии осаждались центрифугированием в течение 10 мин при 2000 об./мин (Thermo Scientific, Германия). Раствор отделяли декантацией и упаривали на роторном испарителе (Heidolph, Германия), экстракты взвешивали. Первичные данные по массе насекомых и экстрактов (смывов) приведены в табл. 2.2 – 2.4.

Таблица 2.1. Данные по смыву эпикутикулярных липидов личинок колорадского жука разных возрастов

Группа личинок, ч после линьки	Масса экстракта, мг	Средняя площадь поверхности кутикулы одной личинки, мм ² (N=3)	Объем растворителя для смыва эпикутикулярного слоя с 80 личинок (мл)
свежеперелинявшие 4-6 ч (N=5)	1.5	80	25
	3.9		
	3.2		
	1.8		
	2.0		
промежуточного возраста 34-36 ч (N=5)	4.1	100.3	31.5
	2.4		
	2.7		
	2.3		
	2.6		
личинки, заканчивающие питание 84-86 ч (N=6)	2.0	132.7	41.5
	3.6		
	1.8		
	2.9		
	2.5		

Таблица 2.2. Данные по смыву эпикутикулярных липидов саранчовых

<i>Locusta migratoria</i>			<i>Calliptamus italicus</i>		
Масса насекомых, г	Масса экстракта, мг	Число насекомых	Масса насекомых, г	Масса экстракта, мг	Число насекомых
8.118	4.85	80	12.48	7.94	80
8.882	5.4		11.735	7.3	
8.67	5.1		10.762	7.03	
9.242	5.6		11.888	7.76	
9.622	6.11		9.766	5.7	
8.648	5.25		10.06	5.53	

Таблица 2.3. Данные по смыву эпикутикулярных липидов колорадского жука

Личинки			Куколки			Имаго		
Число насекомых	Масса насекомых, г	Масса экстракта, мг	Число насекомых	Масса насекомых, г	Масса экстракта, мг	Число насекомых	Средняя масса образца, г	Масса экстракта, мг
80	3.50	1.79	80	9.96	7.09	40	6.48	7.39
	3.44	2.00		8.45	7.13			6.20
	3.53	1.92		10.15	7.41			6.40
	3.59	1.72		8.26	7.40			7.66
	3.35	1.68		9.13	7.53			7.37
	3.32	1.90						

Таблица 2.4. Данные по экстрактам липидов личинок и шкурок до и после обработки грибом *M. robertsii*

Личинки колорадского жука			
Масса личинок, г		Масса экстракта, мг	
Контроль	<i>M. robertsii</i>	Контроль	<i>M. robertsii</i>
3.19	0.92	18.15	8.28
3.05	0.39	18.30	11.04
3.68	0.45	19.02	14.89
2.98	0.48	17.36	11.70
Конидии <i>M. robertsii</i>			
Масса конидий, г		Масса экстракта, мг	
Конидии с ИПС	Конидии с личинок	Конидии с ИПС	Конидии с личинок
0.366	0.201	10.0	1.97
0.213	0.452	6.10	4.16
0.352	0.409	11.66	3.56
0.346	0.450	10.96	3.29
0.375	0.170	11.86	2.23
0.360	0.380	10.65	3.36
Личинные шкурки личинок			
Масса шкурок, мг		Масса экстракта, мг	
Контроль	<i>M. robertsii</i>	Контроль	<i>M. robertsii</i>
53.26	59.37	5.35	2.93
59.51	55.59	5.04	2.85
63.04	55.58	6.44	3.48
50.70	80.52	5.48	4.91

2.8. Дериватизация смывов и экстрактов кутикулярных липидов

Полученные смывы и экстракты эпикутикулы и целого тела насекомых, а также конидий гриба подвергали дериватизации для получения метиловых эфиров свободных и связанных жирных кислот для ГХ/МС анализа. В эксперименте с личинками колорадского жука разных возрастов смывы обрабатывали диазометаном для анализа свободных кислот. К полученному смыву добавляли 1 мл диэтилового эфира и 0.5 мл метилового спирта и 2 мл раствора CH_2N_2 в диэтиловом эфире. Полученный раствор был оставлен для упаривания при комнатной

температуре и атмосферном давлении на 6 ч. Диазометан получали согласно [85]. В эксперименте с саранчовыми смывы подвергались кислотному метанолизу [161] для анализа общего содержания свободных и связанных кислот. К смыву добавляли 9 мл метилового спирта, 1 мл 10%-ой серной кислоты в метиловом спирте и кипятили 3 ч. Полученный раствор охлаждали и добавляли 10 мл дистиллированной воды. Из водно-метанольного раствора для выделения прометилованных эфиров проводили экстракцию смесью петролейного эфира и диэтилового эфира (4:1). Промывали экстракт дистиллированной водой до pH~7. Сушили над $MgSO_4$ 24 часа. В эксперименте с разными фазами онтогенеза колорадского жука смывы последовательно обрабатывали диазометаном и метанолом в серной кислоте для отдельного анализа свободных и связанных кислот. В случае с экстрактами липидов личинок, шкурки и конидий для отдельного анализа свободных и связанных кислот свободные кислоты отделялись смывом 5%-ого раствора KOH. Затем раствор нейтрализовали 5% HCl, сушили над $MgSO_4$ 24 часа, упаривали и взвешивали. Экстракты свободных кислот (полярные) обрабатывались диазометаном, неполярные экстракты со связанными кислотами подвергали кислотному метанолизу. В случае дериватизации диазометаном объем добавляемого раствора диазометана варьировался в зависимости от массы свободных кислот: при массе < 1.0 мг – 2 мл, при массе 1-3 мг – 3 мл, при массе > 4 мг – 4 мл.

2.9. ГХ/МС анализ

Анализ кислот и углеводов эпикутикулы насекомых проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) на газовом хроматографе 6890N с масс-селективным детектором 5975N (Agilent Technologies, США). Использовали кварцевую капиллярную колонку HP-5MS (сополимер 5% бифенил- и 95% диметилсилоксана) длиной 30 м и внутренним диаметром 0.25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0.25 мкм. Объем вводимой пробы 1 мкл, без деления потока. В качестве газа носителя использовали гелий, скорость потока 0.8 мл/мин.

Надежное определение состава и химического строения соединений из многокомпонентной смеси эпикутикулярных углеводов, сложной для хромато-масс-спектрометрического анализа, зависит от температурного режима хроматографирования. Для подбора условий, при которых пики наиболее полно разделяются, были опробованы три изотермических режима (Sterol-izot-260, Sterol-90-izot-260, Sterol-izot-280) и 7 режимов с линейным программированием температуры (Sterol, Sterol1.5G, Sterol2G, Sterol2G310, Sterol3G, Sterol-90-2G, Sterol-90-3G) (табл. 2.5). Помимо качественного разделения для расчета индексов удерживания важно, чтобы все целевые пики и реперные алканы выходили в одной температурной области.

Таблица 2.5. Температурные параметры различных режимов хроматографирования

Программа	Температура инжектора и интерфейса, °С	Начальная температура хроматографирования, °С	Время выдержки при начальной температуре, мин	Скорость нагрева, °С/мин	Время нагрева, мин	Температура плато, °С	Время выдержки на плато, мин	Полное время хроматографирования, мин
Sterol-izot-260	260	50	2	20	10.5	260	76	88.5
Sterol-90-izot-260	260	90	2	20	8.5	260	78	88.5
Sterol-izot-280	280	50	2	20	11.5	280	76	89.5
Sterol	280	50	2	10	23	280	40	65
Sterol1.5G	280	50	2	1.5	153.3	280	25	180.3
Sterol2G	280	50	2	2	115	280	33	150
Sterol2G310	310	50	2	2	130	310	13	193
Sterol3G	280	50	2	3	76.7	280	41	119.7
Sterol-90-2G	280	90	2	2	95	280	23	120
Sterol-90-3G	280	90	2	3	63.3	280	25	90.3

Было установлено, что наиболее оптимальными являются режимы с линейным поднятием температуры: Sterol 2G и Sterol2G310, при которых углеводородные пики наиболее качественно разделяются и выходят вместе с реперными алканами в области линейного программирования температуры. Помимо этого для режима с линейным повышением температуры наблюдалось наименьшее значение фактора асимметрии пика, рассчитанного для *n*-тетроказана, – 1.13 (1.67 для режима Sterol и 1.78 для режима Sterol-90-izot-260). Согласно [162] значение фактора асимметрии должно находиться в пределах 0.8 – 1.5. В эксперименте с личинками колорадского жука разных стадий межличиночного периода использовали режим Sterol2G. Температура инжектора и интерфейса составляла 280°C, а температура колонки менялась по следующей программе: 2 мин выдерживалась при 50°C, затем увеличивалась до 280°C со скоростью 2 °С/мин и выдерживалась при этой температуре в течение 33 мин (табл. 2.5) В экспериментах с тремя онтогенетическими фазами колорадского жука (личинки, куколки, имаго), саранчовыми и личинками, зараженными *M. robertsii*, использовали режим Sterol2G310. Температура инжектора и интерфейса составляла 310°C, температура колонки менялась по следующей программе: 2 мин выдерживалась при 50°C, затем увеличивалась до 310°C со скоростью 2°C/мин и выдерживалась при этой температуре в течение 13 мин (табл. 2.5). Для дальнейшей идентификации компонентов эпикутикулы рассчитывали линейные индексы удерживания (ЛИУ) по формуле (2):

$$J_x = J_n + 100k \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{R(n+k)} - t_{Rn}}, \quad (2)$$

где $J_n = 100n$ – индекс удерживания n -алкана, содержащего в молекуле n атомов углерода, t'_{Rx} – абсолютное время удерживания исследуемого компонента, t'_{Rn} и $t'_{R(n+k)}$ – абсолютные времена удерживания ближайших реперных n -алканов с числом атомов углерода n и $n+k$ соответственно

В экспериментах по определению метрологических характеристик использовался режим Sterol. Температура инжектора и интерфейса составляла 280°C; температура колонки менялась следующим образом: 2 мин выдерживалась при 50°C, затем увеличивалась до 280°C, со скоростью 10°C/мин и сохранялась при этой температуре в течение 20 мин.

Масс-спектры регистрировали в режиме электронной ионизации, энергия ионизации 70 эВ. Определение состава и химического строения метилразветвленных углеводородов проводилось согласно схеме, предложенной Нельсоном и соавторами [6] на основе: 1) сравнения рассчитанных и литературных линейных индексов удерживания [6, 8, 37, 135, 141, 146, 149, 158, 160, 163-172]; 2) анализа характеристичных ионов в масс-спектрах, образующихся при разрыве углеродной цепи в местах разветвления; 3) данных о биохимической осуществимости синтеза метилразветвленных углеводородов насекомых [1,6,173,174]. Для анализа сложных пиков использовали реконструкцию исходной хроматограммы по характеристичным ионам («ионная экстракция»). Линейные индексы удерживания (ЛИУ) рассчитывали с использованием нормальных реперных алканов C24-C41 из нефтяного парафина П-2 (ПАО «Лукойл») и стандартного образца HP 5080-8716 (C5-C40). Идентификация кислот проводилась на основе базы данных NIST 02 MS, находящейся в составе системы обработки данных Agilent G 170 1 AA Chemstation. Установление химического строения кетонов проводили на основе характеристических ионов в масс-спектрах, образующихся при распаде молекулы по связи C-C, связанной с карбонильной группой.

Для количественного определения углеводородов использовали в качестве стандартов n -тетракозан и n -дотриаконтан (Acros Organics); для количественного определения кислот использовали метилстеарат (Acros Organics). Количественному расчету подвергались пики, площадь которых на хроматограмме по полному ионному току (ПИТ) составляла более 0.5%.

2.10. Оценка метрологических характеристик

Были оценены следующие метрологические характеристики количественного определения предельных углеводородов в эпикутикуле: показатели прецизионности в условиях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности, предел обнаружения и линейный динамический диапазон. Показатель повторяемости определен на образце экстракта эпикутикулы итальянского пруса в концентрации 0.5 мг/мл при помощи 12 параллельных измерений концентрации основных соединений. Показатель внутрилабораторной

прецизионности определяли по образцу экстракта эпикутикулы личинок колорадского жука в концентрации 0.1 мг/мл. Образец анализировали на одном и том же оборудовании с разницей в 4 года: в одном измерении было $N_1=12$ (февраль 2018), в другом $N_2=10$ параллельных определений (ноябрь 2022). Предел обнаружения определен при помощи стандартных растворов *n*-октакозана, полученных методом последовательного разбавления: 0.00075, 0.0005, 0.00025 и 0.0001 мг/мл. Для каждой концентрации было 4 параллельных измерения. Линейный динамический диапазон измеряемых концентраций определяли также при помощи стандартных растворов *n*-октакозана в концентрациях 0.15, 0.10, 0.075, 0.05, 0.025, 0.01 и 0.001 мг/мл, для каждой концентрации было 2 параллельных измерения. Все измерения по метрологическим характеристикам проводились в режиме Sterol (см. раздел 2.8).

2.11. Статистическая обработка

Полученные данные были проверены на нормальность с помощью теста Шапиро-Уилка. Значимости отличий для всех парных сравнений проводили с помощью t-теста Стьюдента в случае нормального распределения и U-теста Манна-Уитни в случае ненормального распределения. Значимости отличий между тремя онтогенетическими стадиями колорадского жука были определены с использованием теста Тьюки в случае нормального распределения и теста Данна для ненормального распределения. Различия в динамике смертности оценены с помощью лог-ранк теста. Статистическая обработка содержания основных компонентов липидов насекомых, а также статистическая обработка данных по метрологическим характеристикам проводилась с использованием программного обеспечения Excel 2010. Статистическая обработка масс-спектров метилразветвленных углеводов для выявления характеристичных ионов была проведена с использованием программного обеспечения Origin 5.0. Анализ выживаемости, попарные и множественные сравнения, анализ главных компонент проводились в программах PAST 3.0 [175] и SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc., США).

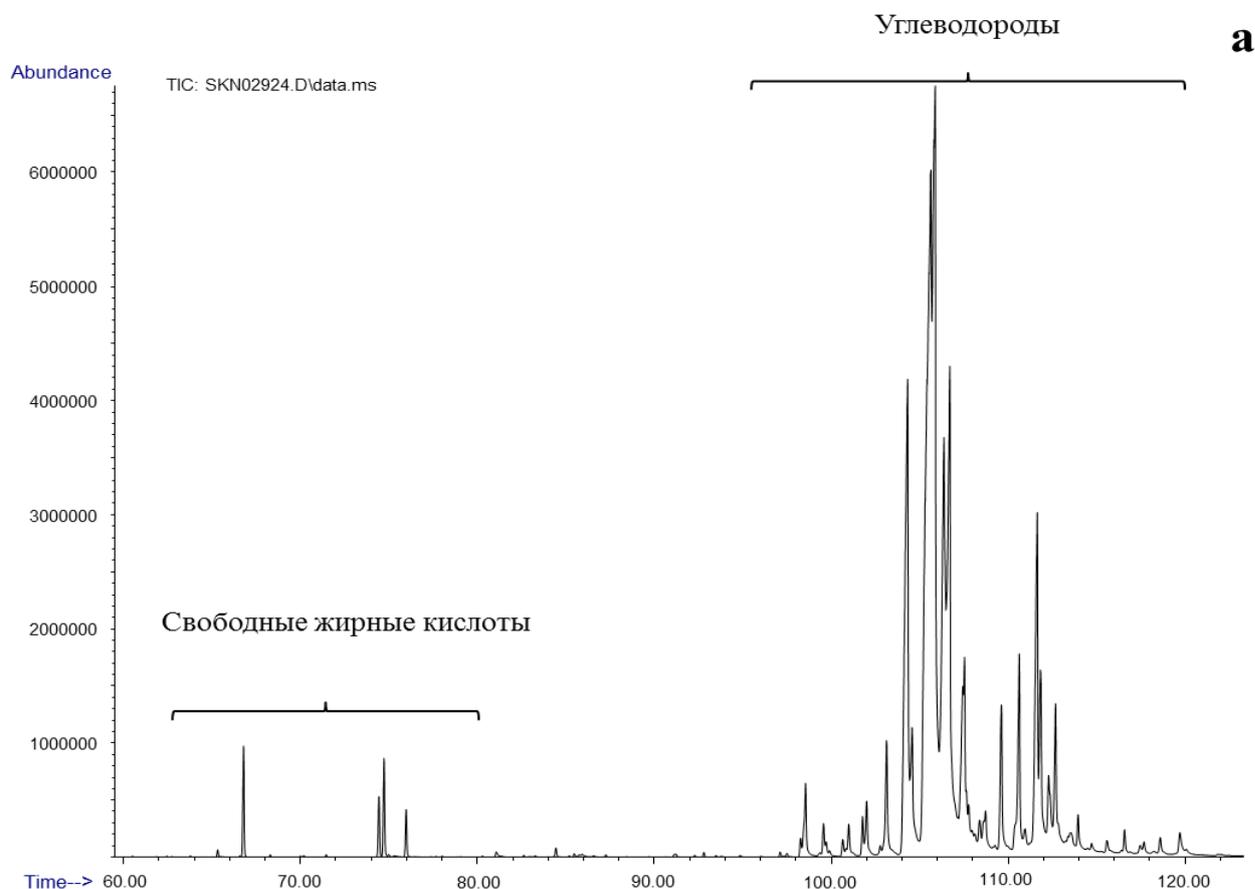
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

3.1.1. Состав, химическое строение и сравнительный анализ эпикутикулярных липидов у личинок в течение IV возраста

Исследование по изучению динамики содержания основных липидов эпикутикулы личинок колорадского жука было проведено в течение IV межличиночного периода через 4-6, 34-36 и 84-86 ч после линьки. IV возраст наиболее продолжительный по времени, и на этой стадии личинки потребляют наибольший объем растительной массы по сравнению с предыдущими возрастами. Поэтому выяснение причин резких изменений восприимчивости к патогенным грибам в течение данного периода является весьма актуальным.

Методом ГХ/МС установлено, что основными компонентами эпикутикулярного слоя личинок IV возраста являлись моно-, ди- и триметилразветвленные алканы состава C_{28} - C_{32} и свободные жирные кислоты состава C_{16} - C_{18} (рис.3.1, табл. 3.1). Доля углеводов в экстракте эпикутикулы составляла более 70%. Среди углеводов для всех возрастных групп основными являлись соединения с длиной цепи C_{30} (рис.3.2a).



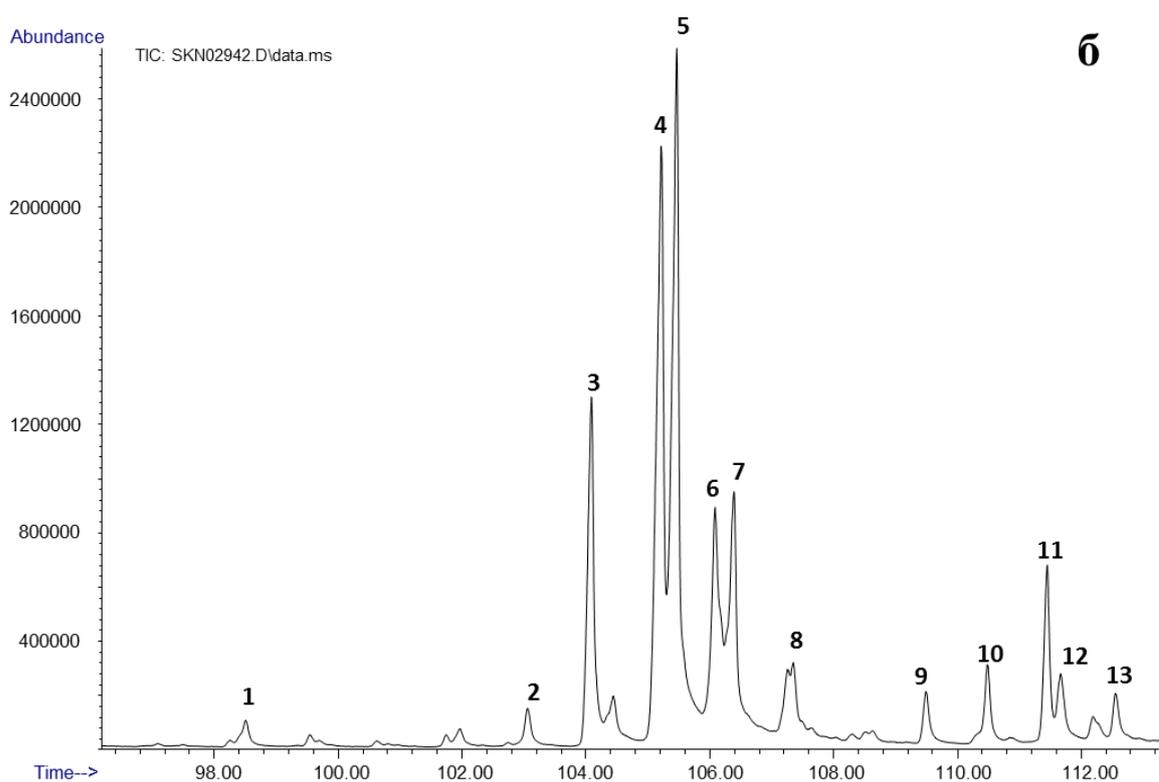


Рис. 3.1. Полный хроматографический профиль экстракта эпикутикулы (а) и хроматографический профиль углеводов эпикутикулы личинок колорадского жука IV возраста (б). Номера пиков соответствуют табл.3.1.

Качественный состав углеводородной композиции не менялся в течение данного периода, но абсолютное суммарное содержание углеводов существенно уменьшалось в процессе роста личинок (рис. 3.2). Так, суммарный уровень углеводов в мкг на см² поверхности насекомых в эпикутикуле заканчивающих питание личинок (84–86 ч) был в 2.1 раза ниже по сравнению со свежеперелинявшими молодыми особями (4–6 ч) (тест Данна, $p = 0.01$). Данный тренд наблюдался для всех углеводов кроме 2,6-диметилтриаконтана, а также для содержания алканов в пересчете на массу экстракта (Приложение 1).

Таблица 3.1. Идентифицированные углеводороды в экстракте личинок колорадского жука

№ пика	Время удерживания, мин	Линейный индекс удерживания	Характеристические ионы, m/z	$M+$	Структура	Брутто-формула
1	98.55	2712	112/113, 308/309	394	2,6-диметилгексакозан	$C_{28}H_{58}$
2	103.09	2836	154/155, 280/281	408	10-метилоктакозан	$C_{29}H_{60}$
3	104.06	2866	364/365, 392/393	408	2- или 4-метилоктакозан	$C_{29}H_{60}$

4	105.15	2900	168/169, 280/281	422	2,10- или 2,18- диметилноктакозан	$C_{30}H_{62}$
5	105.38	2908	112/113, 336/337	422	2,6- диметилноктакозан	$C_{30}H_{62}$
6	106.08	2929	168/169, 196/197, 266/267, 294/295	436	2,10,16- триметилноктакозан	$C_{31}H_{64}$
	106.15	2931	168/169, 294/295	436	2,10,18- триметилноктакозан	$C_{31}H_{64}$
7	106.27	2938	168/169, 280/281	422	11-метилнонакозан	$C_{30}H_{62}$
8	107.35	2966	168/169, 196/197, 266/267, 294/295	436	11,17- диметилнонакозан	$C_{31}H_{62}$
	107.36	2969	168/169, 294/295	436	11,19- диметилнонакозан	$C_{31}H_{64}$
9	109.51	3036	182/183, 280/281	436	12-метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$
10	110.48	3067	392/393, 420/421	436	2- или 4- метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$
11	111.44	3097	196/197, 280/281	450	2,12- или 2,18- диметилтриаконтан	$C_{32}H_{66}$
12	111.65	3109	112/113, 364/365	450	2,6-диметилтриаконтан	$C_{32}H_{66}$
13	112.55	3132	196/197, 280/281	450	13-метилгентриаконтан	$C_{32}H_{66}$

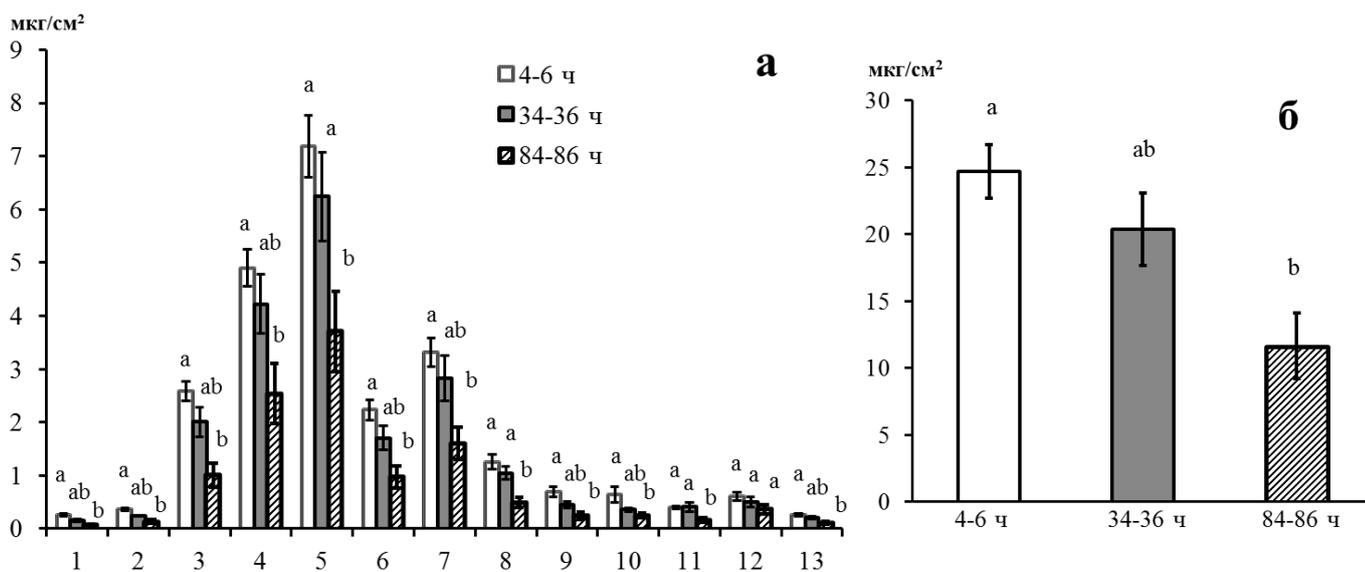


Рис. 3.2. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание углеводов в эпикутикуле личинок в течение IV возраста. Использовано 5 повторностей для свежеперелинявших и промежуточных личинок, 6 повторностей для заканчивающих питание личинок, по 80 личинок в каждой стадии. Разные буквы указывают значительные различия между группами (тест Данна, $p < 0.05$). Номера соединений соответствуют табл. 3.1.

В эпикутикуле личинок колорадского жука были идентифицированы свободные жирные кислоты: пальмитиновая (C16:0), линолевая (C18:2), олеиновая (C18:1), линоленовая (C18:3) и стеариновая (C18:0). Доля свободных жирных кислот в экстракте не превышала 8%. Общее содержание свободных кислот существенно не изменялось в течение IV возраста (табл. 3.2, рис.3.3). Качественный состав жирнокислотных композиций был одинаковым для всех возрастных групп с преобладанием пальмитиновой кислоты на каждой стадии. Содержание свободных жирных кислот в пересчете на массу экстракта приведено в Приложении 2.

Таблица 3.2. Идентифицированные свободные жирные кислоты в эпикутикуле личинок колорадского жука на разных стадиях IV возраста. (По 5 повторностей для свежеперелинявших и заканчивающих питание личинок, 4 повторности для промежуточных)

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	M+, m/z	Название	Структура	Содержание, мкг/см ² поверхности личинки		
						4-6 ч	34-36 ч	84-86 ч
1	66.75	1929	270	Пальмитиновая	C16:0	1.12±0.28	1.56±0.34	0.93±0.22
2	74.42	2095	294	Линолевая кислота	C18:2	0.35±0.10	0.54±0.18	0.23±0.05
3	74.69	2101	292	Линоленовая кислота	C18:1	0.12±0.04	0.23±0.06	0.23±0.05
4	74.70	2101	296	Олеиновая кислота	C18:3	0.50±0.16	0.62±0.21	0.40±0.12
5	75.96	2130	298	Стеариновая кислота	C18:0	0.42±0.13	0.43±0.11	0.31±0.08
Сумма:						2.5±0.5	3.4±0.6	2.1±0.5

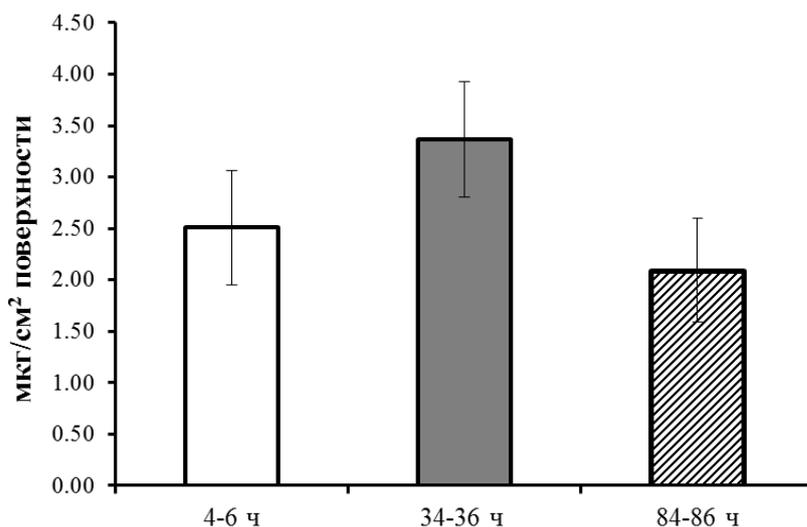


Рис. 3.3. Суммарное содержание свободных жирных кислот в эпикутикуле личинок колорадского жука в течение IV межлиночного периода. По 5 повторностей для свежеперелинявших и заканчивающих питание личинок, 4 повторности для промежуточных личинок, по 80 личинок в каждой стадии

В указанный период мы регистрировали резкие изменения в восприимчивости личинок к грибам *Metarhizium*. Так, свежеперелинявшие личинки были высоко восприимчивы к грибам, тогда как к концу этого периода они становились существенно более устойчивыми к патогену

(рис.3.4а): полулетальное время (LT_{50}) составило 6 ± 0.3 суток для свежеперелинявших личинок и 10 ± 0.3 суток для промежуточных (34-36 ч) личинок ($\chi^2 > 4.22$, $df = 1$, $p < 0.04$). Смертность заканчивающих питание личинок (84-86 ч) не достигала и 50% и существенно отличалась от свежеперелинявших и промежуточных насекомых ($\chi^2 = 24.31$, $df = 1$, $p < 0.0001$ и $\chi^2 = 17.89$, $df = 1$, $p < 0.0001$ соответственно). Такая же тенденция наблюдалась и для уровня адгезии конидий к кутикуле (рис.3.4б): у промежуточных и заканчивающих питание личинок количество адгезированных конидий к кутикуле было в 3-5 раз ниже по сравнению со свежеперелинявшими насекомыми (тест Данна, $p < 0.01$). При этом уровни адгезии к кутикуле промежуточных и заканчивающих питание личинок не отличались существенно ($p = 0.68$).

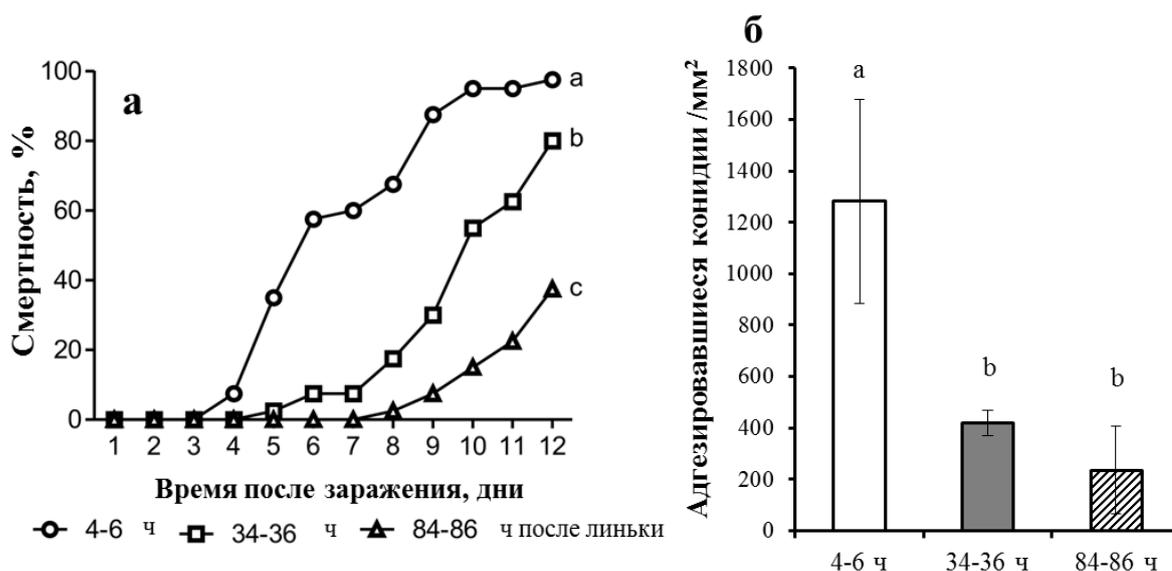


Рис. 3.4. Динамика смертности личинок колорадского жука, зараженных *M. robertsii*, через 4-6, 34-36 и 84-86 ч после линьки в IV возрасте (а), разные буквы указывают значимые отличия (лог-ранк тест: $\chi^2 > 4.22$, $df=1$, $p < 0.04$); уровень адгезии конидий к кутикуле личинок колорадского жука в течение IV возраста (б), по 9 биологических повторностей для свежеперелинявших и заканчивающих питание личинок и 7 повторностей для промежуточных личинок. Разные буквы указывают значимые отличия между выборками (тест Данна, $p < 0.01$)

Мы предполагаем, что уменьшение содержания углеводов в процессе межлиночного периода последнего возраста может быть связано со сменой среды обитания. В начале последнего возраста личинки обитают на листьях и характеризуются тонкой кутикулой [108], поэтому имеют высокий риск обезвоживания. При этом питающиеся на растениях личинки очень редко инфицируются грибами [176]. В свою очередь заканчивающие питание личинки имеют более толстую кутикулу и переходят в почву для формирования предкуколки. В почвенной среде, с одной стороны, вероятность обезвоживания низка, но с другой стороны высок риск заражения грибными патогенами. То есть предотвращение обезвоживания является фактором опасности для свежеперелинявших личинок, в то время как заканчивающие питание личинки должны быть более устойчивыми к почвенным микроорганизмам.

По-видимому, уменьшение содержания углеводов в кутикуле личинок колорадского жука в течение IV периода приводит к уменьшению гидрофобности кутикулы и, следовательно, к уменьшению уровня адгезии конидий. Известно, что пассивная, неспецифическая адгезия гидрофобных конидий определяется гидрофобными взаимодействиями, происходящими между стенками конидий и эпикутикулярным слоем насекомых [13]. Удаление углеводов C20-C31 с поверхности кутикулы клопов *Nezara viridula* приводило к сокращению уровня прикрепления конидий *Metarhizium* в 2.5 раза [88]. Помимо этого, наблюдалась положительная корреляция между степенью гидрофобности кутикулы и адгезией грибных спор в системе непарный шелкопряд – энтомофторовый гриб *Entomophaga maimaiga* [177]. Углеводы служат важным источником питания для роста энтомопатогенных грибов. Виды *Metarhizium* утилизируют насыщенные линейные и метилразветвленные углеводороды [89], которые способствуют прорастанию и формированию аппресориев [92, 178]. Авторы этих работ показали, что как линейные, так и разветвленные алканы стимулировали прорастание конидий *M. robertsii* и *M. acridum in vitro*. Более того, обработка кутикулы пустынной саранчи неполярными растворителями – гексан, пентан – приводила к замедлению прорастания спор [92]. Тюрин и соавторы [107], Томилова и соавторы [108] зафиксировали усиление прорастания *M. robertsii* на эпикутикулярных экстрактах колорадского жука, нанесенных на агарозу, по сравнению с чистыми растворителями. Однако не было выявлено значительных различий в уровне прорастания на экстрактах разных возрастных групп [108]. Возможно, такие результаты наблюдаются из-за специфики распределения углеводов в кутикуле живой личинки и поверхности агарозы.

Таким образом, уровень углеводов в кутикуле положительно коррелировал с уровнями адгезии и смертности на разных этапах межличиночного периода. Можно полагать, что уменьшение общего содержания кутикулярных углеводов в последнем возрасте является одним из адаптивных механизмов защиты личинок от инфицирования грибами при переходе в почву.

3.1.2. Состав, химическое строение и сравнительный анализ эпикутикулярных липидов у личинок, куколок и имаго колорадского жука

Методом ГХ/МС был проведен анализ углеводов, свободных и связанных жирных кислот из кутикулярных липидов колорадского жука на разных фазах жизненного цикла: личинки, куколки, имаго. Помимо этого получены данные о липидном составе шкурки жуков, перелинявших из предкуколки в куколку и из куколки в имаго, для подтверждения состава поверхностных липидов и исключения влияния попадания жирового тела и гемолимфы в экстракты (смывы) эпикутикулярных липидов. Важно отметить, что в отличие от личинок, куколки и имаго в десятки раз более устойчивы к энтомопатогенным грибам. В частности, при

инфицировании насекомых *M. robertsii* в концентрации $2 \cdot 10^7$ конидий/мл гибель за 10 суток составила 100%, 10% и 0% для личинок, куколок и имаго соответственно ($N = 40$, $\chi^2 > 15.0$, $df = 1$, $p < 0.001$).

3.1.2.1. Углеводы

Методом ГХ/МС в эпикутикулярном слое исследуемых фаз онтогенеза колорадского жука обнаружены предельные моно-, ди- и триметилразветвленные углеводороды состава C28-C40. Всего идентифицировано 48 соединений, из них 23 у личинок, 28 у куколок и 48 у имаго. В экстракте эпикутикулы всех онтогенетических фаз нормальные и ненасыщенные углеводороды отсутствовали. Хроматограммы углеводородных профилей эпикутикулы трех фаз развития представлены на рис. 3.5. Идентифицированные углеводороды приведены в таблице в Приложении 3.

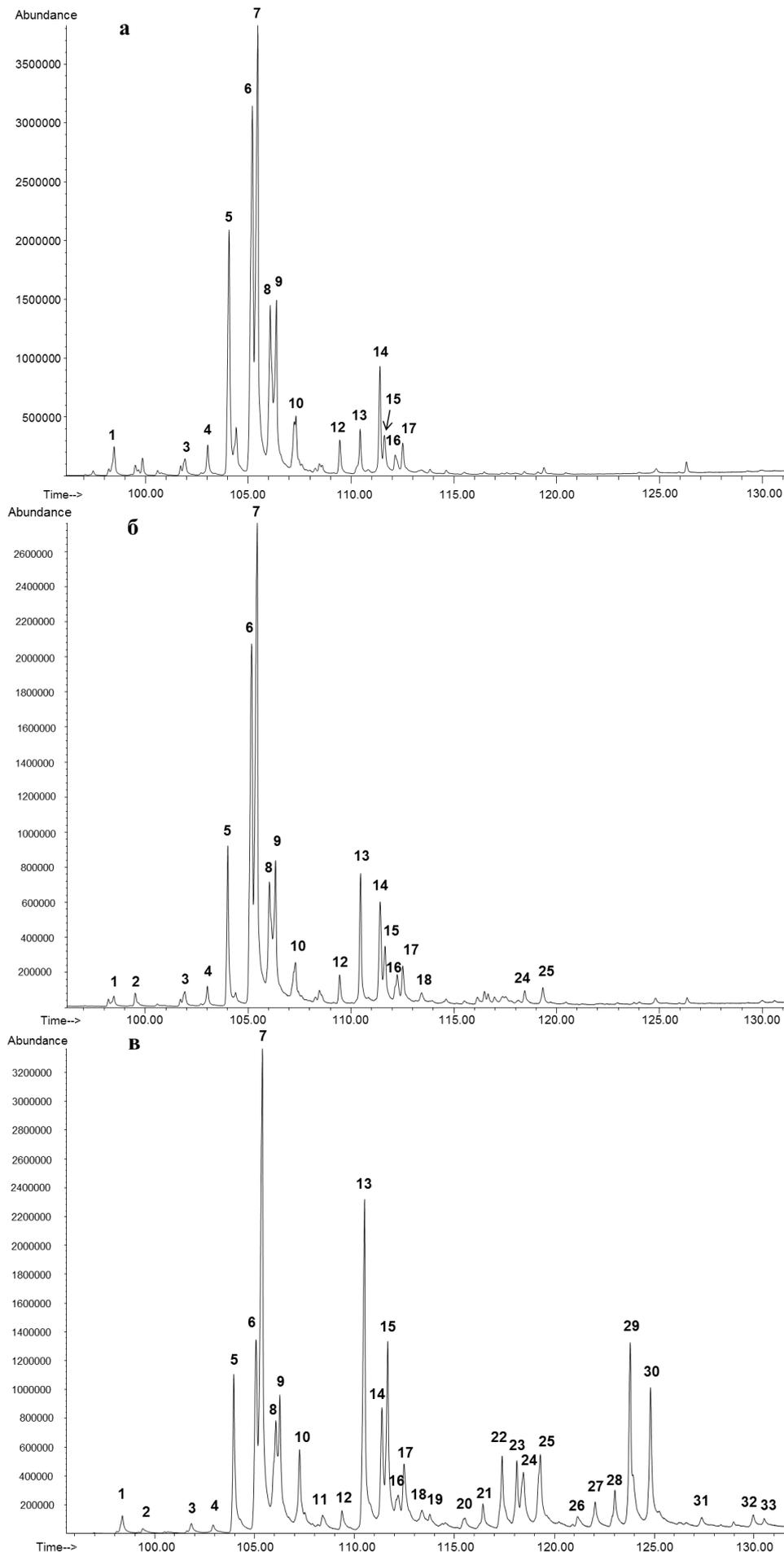


Рис.3.5. Хроматограммы углеводородных профилей личинок (а), куколок (б) и имаго (в) колорадского

жука. Номера пиков соответствуют таблице в Приложении 3

В ряду личинки-куколки-имаго углеводородный профиль значительно сдвигался в более длинноцепочечную область: так, в относительно легкоцепочечной области (С28-С31) отмечено снижение содержания компонентов в ряду личинки-куколки-имаго ($p < 0.01$, рис. 3.6). В среднецепочечной области (С32-С35) наблюдалась обратная тенденция ($p < 0.02$). Самая длинноцепочечная область (С36-С40) была представлена только у имаго. По количеству метильных разветвлений самой большой группой во всех стадиях были диметилалканы (рис. 3.6). Интересно, что общее содержание углеводов в экстракте эпикутикулы имаго имело тенденцию к снижению по сравнению с личинками, хотя различия были несущественными ($p = 0.1$).

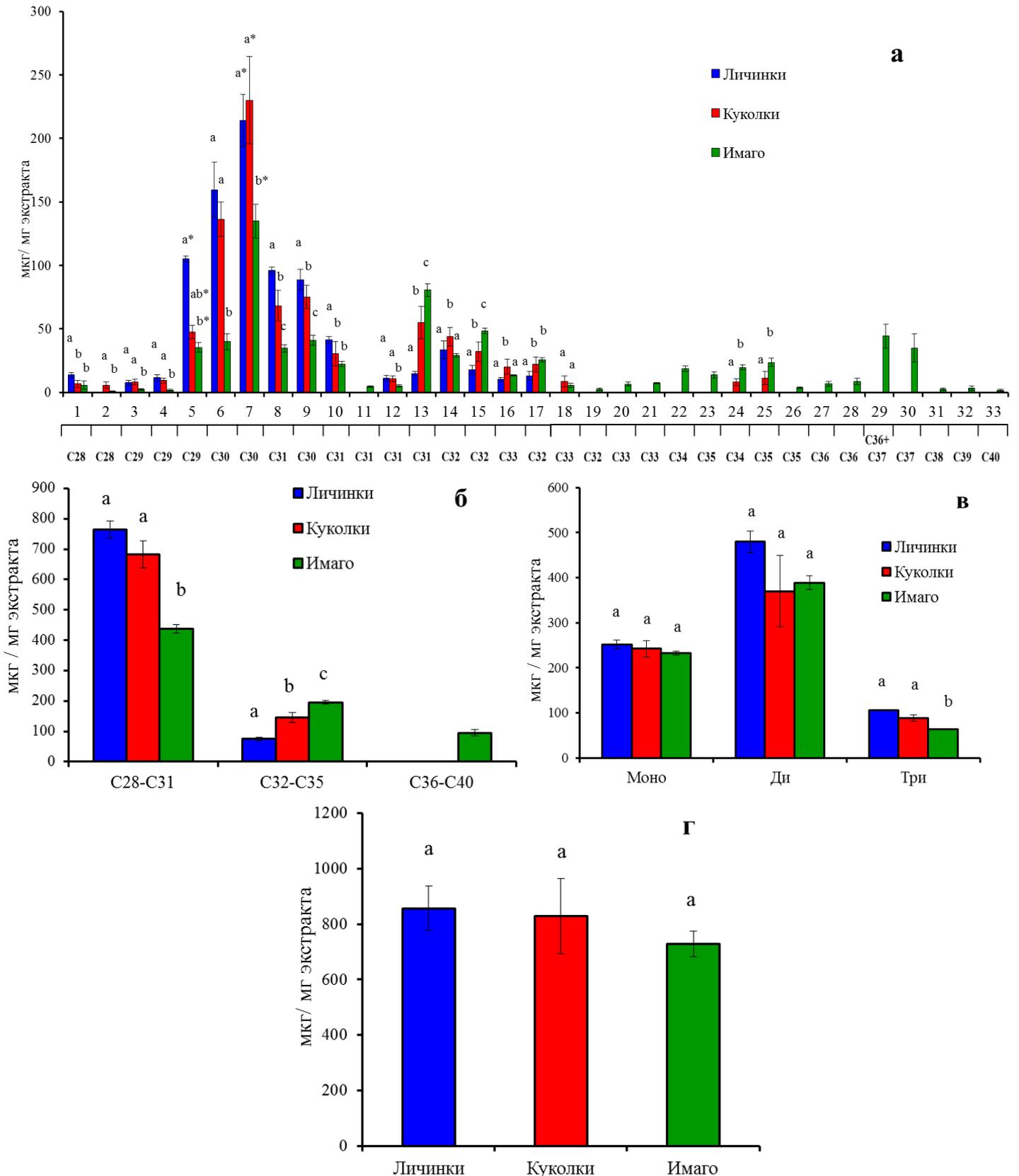


Рис. 3.6. Содержание индивидуальных углеводов (а), распределение углеводов по общему количеству атомов углерода (б), по степени разветвленности (в) и суммарное содержание углеводов (г) в эпикутикуле личинок, куколок и имаго колорадского жука. Использовано 5 биологических повторностей для каждой фазы развития. Одна повторность = 80 насекомых для личинок и куколок, 40 насекомых для имаго. Разные буквы указывают значимые отличия (тест Тьюки, *тест Данна, $p < 0.05$). В случаях отсутствия компонента в одном из вариантов сравнения не проводили. Номера соединений соответствуют таблице в Приложении 3.

В каждой фазе онтогенеза колорадского жука главным углеводородом был 2,6-диметилноктакозан (пик №7), принадлежащий к группе терминально разветвленных диметилалканов (рис. 3.6а). Его содержание в фазе имаго было существенно меньше по сравнению с куколками и личинками ($p < 0.02$). Самый широкий набор метилразветвленных углеводородов был представлен у имаго. Все компоненты, обнаруженные в фазах личинки и куколки, присутствовали и у взрослого жука.

Для кутикулярных углеводородов трех фаз развития колорадского жука был проведен анализ главных компонент (рис. 3.7). При этом наблюдалась четкая кластеризация углеводородных композиций исследуемых фаз, преимущественно по 1-й компоненте, объясняющей 84% вариативности. Наиболее значимый вклад в формировании углеводородной композиции личинок вносили короткоцепочечные углеводороды: №5 (4- и/или 2-метилноктакозан), 6 (2,10- и/или 2,18-диметилноктакозан), 8 (2,10,16- и 2,10,18-триметилноктакозан), 9 (11-метилнонакозан); в композиции куколок – 2,6-диметилноктакозан (№7); в композиции имаго – длинноцепочечные углеводороды: №29 (2,10,16- и 2,10,18-триметилтетра триаконтан + 17-метилпента триаконтан) и 30 (11,19-, 11,23-, 13,19- и/или 13,23-диметилпента триаконтан).

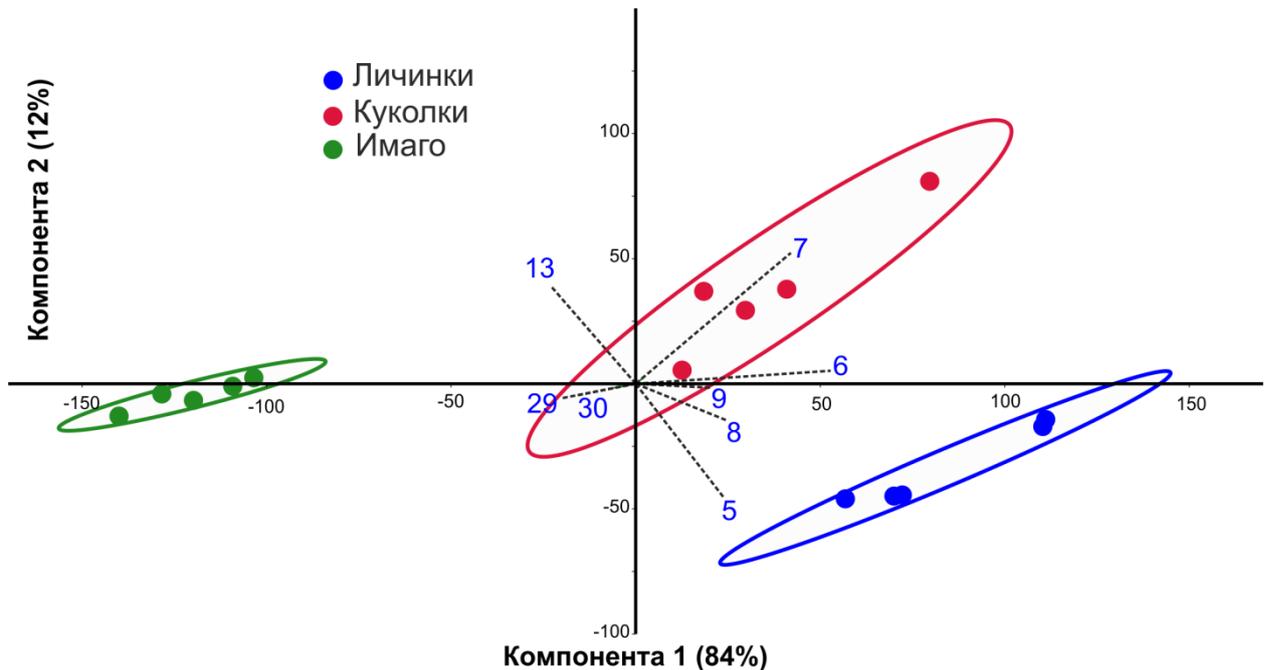


Рис. 3.7. Анализ главных компонент для эпикутикулярных углеводородов разных фаз развития колорадского жука. Номера соединений соответствуют таблице в Приложении 3: 5 – 4- и/или 2-метилноктакозан; 6 – 2,10- и/или 2,18-диметилноктакозан; 7 – 2,6-диметилноктакозан; 8 – 2,10,16- и 2,10,18-триметилноктакозан; 9 – 11-метилнонакозан; 13 – 4- и/или 2-метилтриаконтан; 29 – 2,10,16- и 2,10,18-триметилтетра триаконтан + 17-метилпента триаконтан; 30 – 11,19-, 11,23-, 13,19- и/или 13,23-диметилпента триаконтан

3.1.2.2. Жирные кислоты

В эпикутикуле всех исследуемых фаз колорадского жука идентифицированы свободные и связанные жирные кислоты состава C14-C22, всего обнаружено 26 кислот (6 свободных и 9 связанных у личинок, 6 свободных и 17 связанных у куколок, 9 свободных и 10 связанных у имаго). Общая доля свободных и связанных кислот у личинок и имаго не превышала 2% от экстракта эпикутикулярных липидов, тогда как у куколок достигла 25%. Содержание связанных жирных кислот в эпикутикуле куколок колорадского жука было более чем в 10 раз выше по сравнению с эпикутикулой личинок и имаго (рис. 3.8а): 13.5 ± 1.4 , 151.6 ± 15.0 и 14.8 ± 0.7 мкг/мг экстракта кутикулы для личинок, куколок и имаго соответственно (тест Тьюки, $p < 0.001$). Данный эффект обусловлен преимущественно содержанием основных насыщенных C16:0, C18:0, а также ненасыщенных кислот C18:2 и C18:1 (рис. 3.8б).

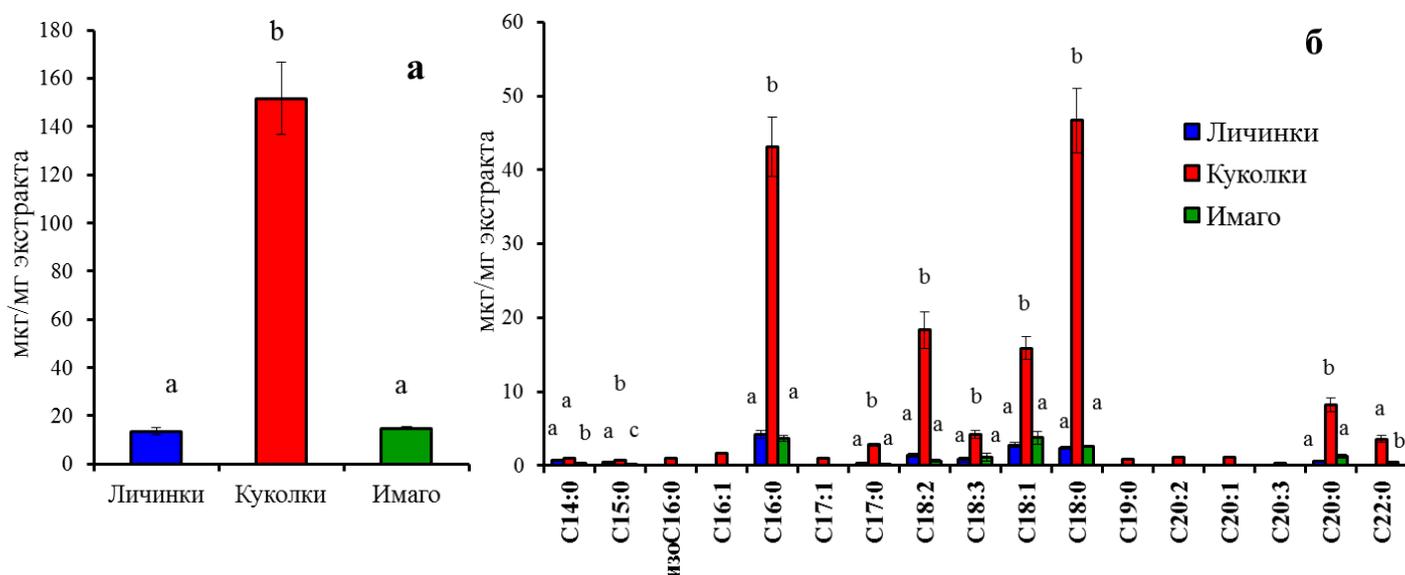


Рис. 3.8. Суммарное (а) и индивидуальное (б) содержание связанных жирных кислот в эпикутикуле личинок, куколок и имаго колорадского жука. Использовано 5 биологических повторностей для личинок и имаго и 4 для куколок. Одна повторность = 80 насекомых для личинок и куколок, 40 насекомых для имаго. Разные буквы указывают значимые различия (тест Тьюки, $p < 0.05$). В случаях отсутствия компонента в одном из вариантов сравнения не проводили

Для свободных жирных кислот наблюдалась другая тенденция. Их суммарное содержание повышалось в течение онтогенеза (рис.3.9а) и составило 5.0 ± 0.4 , 11.2 ± 1.6 и 13.5 ± 1.3 мкг/мг экстракта кутикулы для личинок, куколок и имаго соответственно. При этом уровень свободных кислот в личинках значимо отличался от уровня в куколках и имаго (тест Тьюки, $p < 0.003$). Следует отметить, если у куколок повышение было обусловлено насыщенными кислотами C16:0, C18:0, то у имаго – ненасыщенными кислотами C18:1 и C18:2 (рис. 3.9б). В целом, соотношение насыщенных и ненасыщенных свободных жирных кислот изменялось в ряду личинки-куколки-имаго как 3:1, 4:1 и 1:2 соответственно. Таким образом в

эпикутикуле имаго наблюдается значительное повышение содержания ненасыщенных жирных кислот.

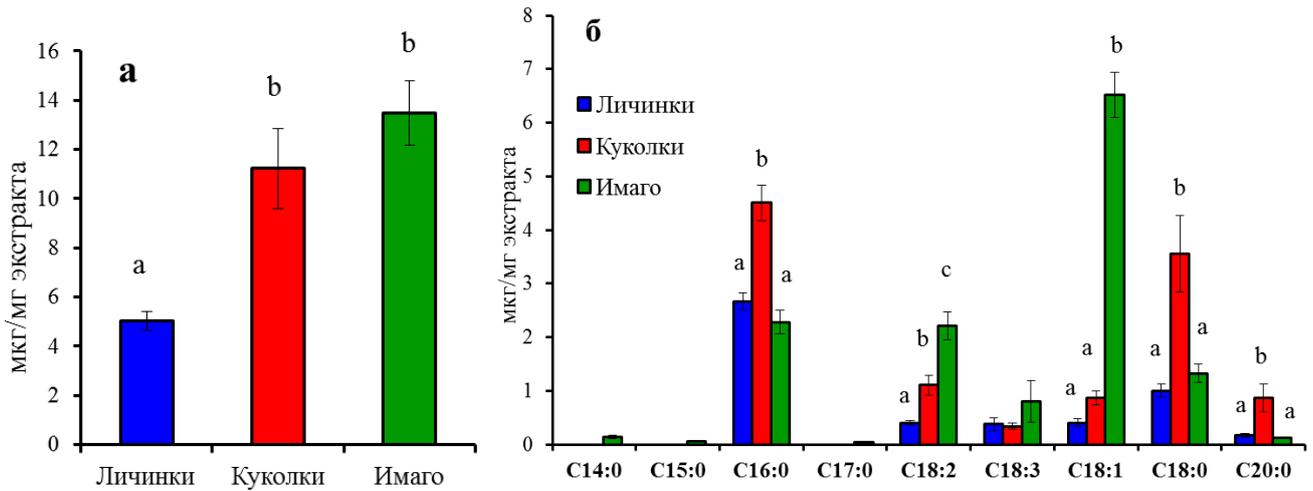
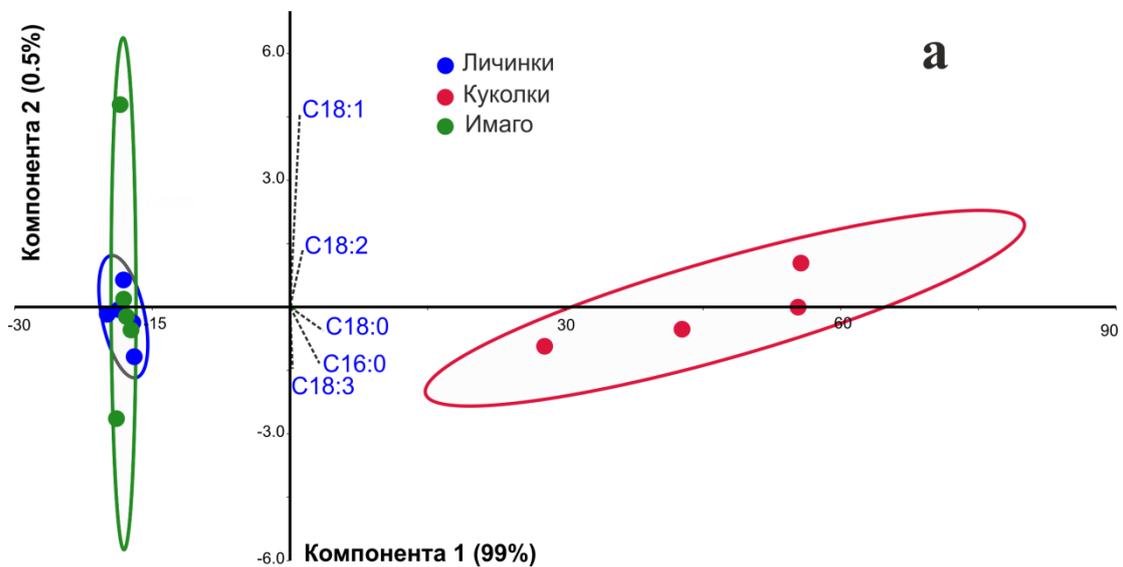


Рис. 3.9. Суммарное (а) и индивидуальное (б) содержание свободных кислот в эпикутикуле личинок, куколок и имаго колорадского жука. По 6 биологических повторностей для личинок и имаго и 4 для куколок. Одна повторность = 80 насекомых для личинок и куколок, 40 насекомых для имаго. Разные буквы указывают значимые отличия (тест Тьюки, $p < 0.05$)

При анализе главных компонент для связанных жирных кислот наблюдалась отчетливая кластеризация композиции куколок от композиции личинок и имаго колорадского жука по 1-й компоненте (рис. 3.10а). При этом наибольший вклад в кластеризацию вносили доминирующие кислоты C16:0 и C18:0, количество которых резко повышалось у куколок. Для свободных жирных кислот отмечалась четкая кластеризация композиции имаго от личинок и куколок по 1-й компоненте (рис. 3.10б), при этом наиболее сильные вклады вносили ненасыщенные кислоты C18:1, C18:2, C18:3 содержание которых повышалось у имаго. Также отмечена некоторая дискриминация между композициями личинок и куколок по 2-й компоненте, обусловленная повышением свободных жирных кислот C16:0 и C18:0 у последних.



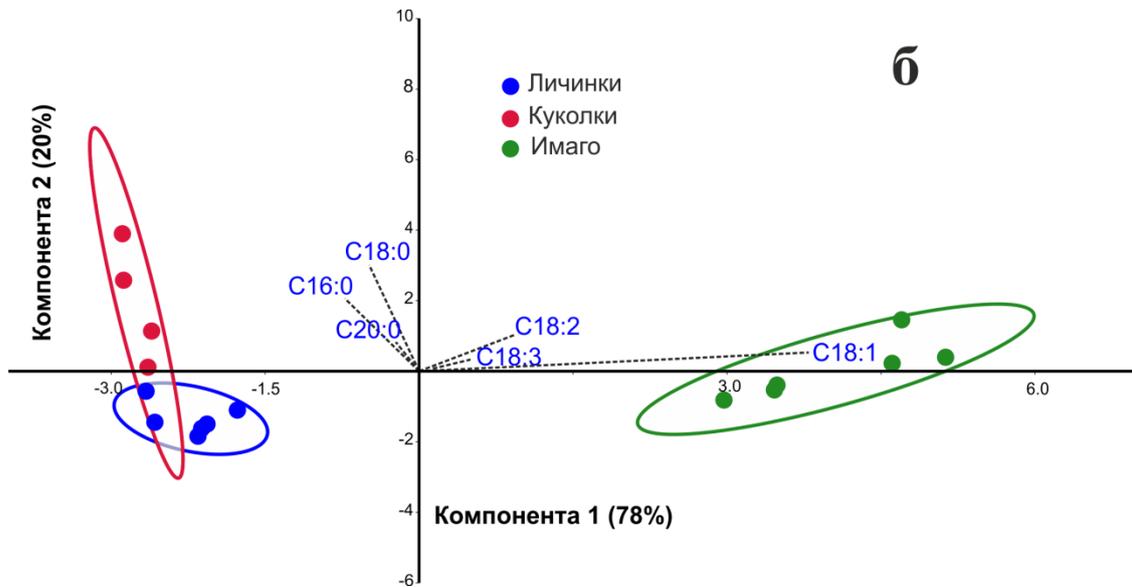


Рис. 3.10. Анализ главных компонент для связанных (а) и свободных (б) жирных кислот из эпикутикулы разных фаз развития колорадского жука

Большое количество связанных жирных кислот в эпикутикуле насекомых является необычным феноменом. Поэтому в последующих экспериментах нам необходимо было выяснить, является ли резкое повышение эпикутикулярных связанных жирных кислот у куколок действительным, или же обусловлено попаданием жирового тела или гемолимфы в экстракт. Для этого нами были получены личинные шкурки личинок последнего возраста (предкуколок) и куколок, проведена их экстракция и анализ. Установлено, что в личинных шкурках предкуколок и куколок содержатся как свободные, так и связанные жирные кислоты, основными из которых были C16:0, C18:2, C18:1 и C18:0. Общее содержание жирных кислот в шкурках предкуколок и куколок не отличалось (рис. 3.11, тест Стьюдента, $p > 0.3$), однако содержание связанных кислот было в 10 раз выше, чем свободных (тест Стьюдента, $p < 0.01$). Таким образом, мы показали, что высокое содержание связанных жирных кислот в кутикуле куколок колорадского жука является нормой, а не методическим артефактом, при этом повышенный уровень связанных жирных кислот в эпикутикуле наблюдается уже на стадии предкуколки.

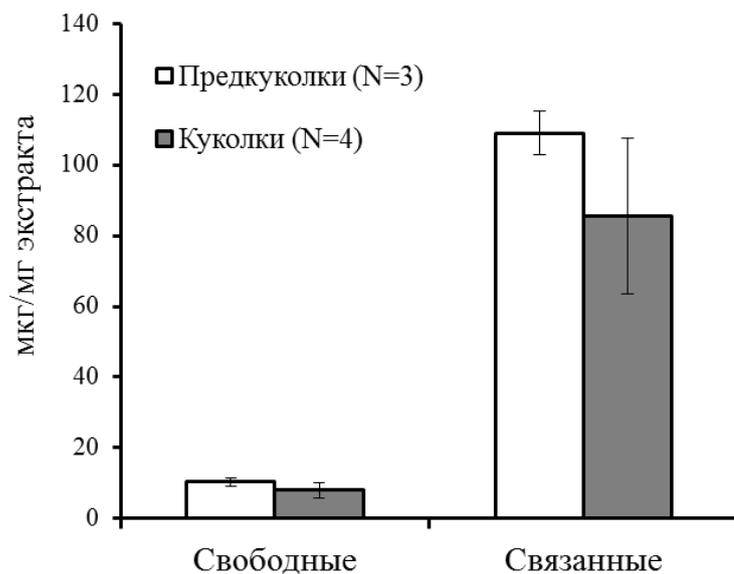


Рис. 3.11. Суммарное содержание жирных кислот в экстрактах личинных шкурок предкуколок и куколок колорадского жука. По 3 биологических повторности для предкуколок и 4 для куколок, по 80 шкурок в каждой

При сравнительном анализе состава эпикутикулярных углеводов в ряду личинки-куколки-имаго колорадского жука было показано, что углеводородный профиль смещается в более длинноцепочечную область на взрослой стадии (рис. 3.5, 3.6). Этот сдвиг, вероятно, связан с большим многообразием сред жизни имаго жука (растения, почва), большим диапазоном воздействий абиотических факторов (влажность, температура), поскольку имаго активны во все летние месяцы, а также перезимовывают при отрицательных температурах (до -8°C) [179]. Кроме того, более широкий диапазон углеводов у имаго может быть связан с их вовлечением во внутривидовые коммуникации, в частности межполовые взаимодействия. Схожие результаты по углеводородам имаго колорадского жука были получены и в работе [6]: главными компонентами эпикутикулы являлись моно-, ди- и триметилразветвленные алканы, при этом диапазон углеводородного профиля составил C29-C40. Интересно, что содержание 2-метилоктакозана, 2,10- и 2,6-диметилоктакозана, 2,10,16- и 2,10,18-триметилоктакозана, 2,12- и 2,10-диметилтриаконтана, и особенно длинноцепочечных 2,10,16- и 2,10,18-триметилдотриаконтанов у самок было выше более чем в 2 раза по сравнению с самцами. Последнее указывает на возможную функцию метилразветвленных алканов как контактных феромонов.

Различия в углеводородном профиле кутикулы между полами показаны и для мух *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina* и подсолнечного листоеда *Zygotogramma exclamationis* [53, 54, 60]: это также может служить свидетельством их участия в половом распознавании. В ряде работ также отмечается сдвиг углеводородного профиля у мух (*L. sericata*, *Sarcophaga bullata*) в более длинноцепочечную область у имаго по сравнению с более ранними фазами развития [53, 58]. Так, появление более длинноцепочечных алканов у взрослых цикад *Diceroprocta apache*

объясняется сменой среды обитания [55]: длинноцепочечные компоненты помогают насекомым предотвращать обезвоживание в пустыне, тогда как наяды *D. apache* живут в почве, где потеря воды не так существенна, и присутствие длинноцепочечных компонентов не обязательно. Еще одним механизмом защиты от обезвоживания на взрослой стадии может служить повышение абсолютного содержания углеводов в кутикуле имаго [55-57].

По степени разветвления на каждой стадии основной группой были диметилразветвленные алканы. Интересно, что у других видов насекомых наблюдается другое распределение углеводородных композиций в процессе развития. Так, на разных фазах развития мухи *L. sericata* доминировали *n*-алканы, но абсолютное количество повышалось у имаго [53]. Также показано, что на стадии имаго у мух *L. cuprina* [54], табачного жука *Lasioderma serricorne* [57] и подсолнечного листоеда *Z. exclamationis* [60] углеводородный профиль сдвигается от нормальных в сторону метилразветвленных алканов.

Нами установлено повышение содержания ненасыщенных жирных кислот C18:2, C18:3, C18:1 в свободном виде в эпикутикуле имаго колорадского жука. Подобные результаты получены для мух *Sarcophaga carnaria* [67] и *Sarcophaga argyrostoma* [72]: у имаго *S. carnaria* в кутикуле наблюдался более высокий уровень свободных жирных кислот C16:1, C17:1, C18:2, C19:1, C20:5, C20:4 и C20:1 по сравнению с более ранними фазами; у взрослых особей *S. argyrostoma* было значительно выше содержание C16:1, C17:1, C18:1, C20:5 по сравнению с личинками и куколками. В целом, суммарное содержание свободных жирных кислот в эпикутикуле так же повышается на взрослой стадии, как и в нашем исследовании. По мнению авторов ряда работ [70, 71] жирные кислоты C18:1 и C18:2 служат предшественниками в синтезе половых феромонов. В то же время полиненасыщенные жирные кислоты могут вносить вклад в устойчивость имаго к грибному патогену. В экспериментах *in vitro* показано, что ненасыщенные жирные кислоты, в частности 18:1, 18:2, 18:3, ингибируют рост энтомопатогенных грибов [69, 100, 101], а также снижают активность гидролитических ферментов гриба *C. coronatus* [15, 106], определяющих его вирулентность. Таким образом можно полагать, что повышение уровня полиненасыщенных кислот на стадии имаго колорадского жука связано с их вовлечением в синтез половых гормонов, и в то же время эти кислоты определяют устойчивость к патогенам.

Уменьшение общего содержания углеводов в кутикуле в онтогенетическом ряду также может вносить вклад в повышенную резистентность имаго к *M. robertsii*. Как указывалось выше (раздел 3.1.1), углеводороды важны для адгезии, прорастания и роста конидий в кутикуле [88-90, 92, 177], влияют на вирулентность гриба [91]. Таким образом снижение содержания углеводов в кутикуле имаго может снижать ее аттрактивность для гриба.

3.2. Анализ трансформации состава липидов личинок колорадского жука при микозе

Как указывалось ранее, энтомопатогенные грибы способны метаболизировать углеводороды и жирные кислоты насекомого-хозяина [92, 94, 96], однако изменения липидных композиций при микозах в моделях *in vivo* слабо изучены. Было проведено исследование изменений липидного состава целого тела личинок колорадского жука IV возраста при колонизации грибом *M. robertsii*. Кроме того были проанализированы личинные шкурки личинок IV возраста для понимания процесса утилизации липидов кутикулы колорадского жука грибом независимо от изменений метаболизма живых насекомых, возникающих при микозах.

3.2.1. Липиды целого тела насекомых

В липидах целого тела здоровых и/или колонизированных грибом личинок колорадского жука IV возраста идентифицированы предельные метилразветвленные углеводороды состава C28-C32. У колонизированных грибом насекомых суммарное содержание углеводородов уменьшалось в 16 раз (тест Стьюдента, $p < 0.001$, Приложение 4, рис. 3.12). Значительное сокращение содержания после колонизации личинок грибом выявлено для всех идентифицированных углеводородов, при этом наибольшее уменьшение наблюдалось для 2,10-и/или 2,18-диметилэктозанов (в 30.5 раз), для 4- и/или 2-метилэктозанов, 2,6-диметилэктозана и 11-метилнонакозана (в 16 раз), для 12-метилтриаконтана (в 13 раз). Наименьшее сокращение наблюдалось для 4- и/или 2-метилтриаконтанов и 13-метилгептриаконтана (в 3 раза), а 10-метилэктозан, 11,19- и 11,17-диметилнонакозаны, 2,12-и/или 2,18-диметилтриаконтаны и 2,6-диметилтриаконтан не детектировались после колонизации (Приложение 4, рис. 3.12).

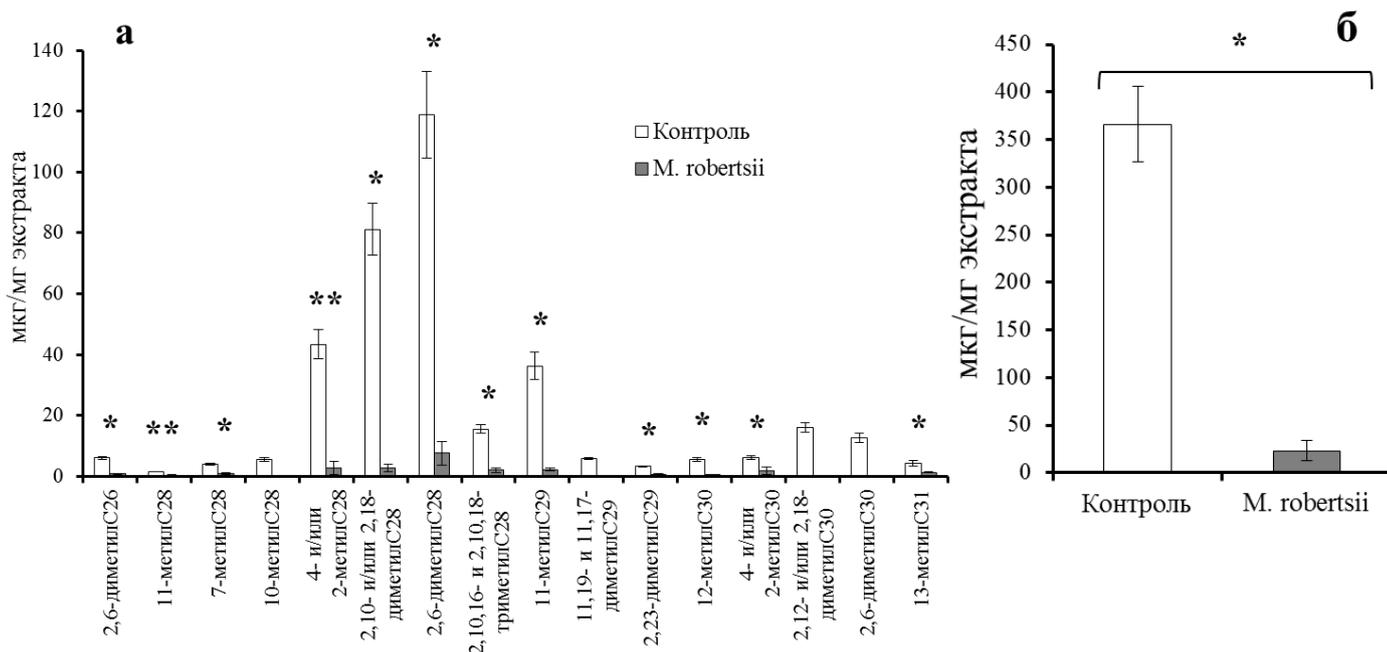


Рис. 3.12. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание углеводов в экстрактах целого тела живых (контроль) и колонизированных грибом *M. robertsii* личинок колорадского жука. Использовано 4 биологических повторности, по 40 особей в каждой. Значимые отличия: *тест Стьюдента, **тест Манна-Уитни, $p < 0.05$. В случаях отсутствия компонента в одном из вариантов сравнения не проводили

В экстрактах целого тела также обнаружены свободные и связанные жирные кислоты. Общее содержание свободных кислот C12-C20 сокращалось в 3.8 раза (тест Стьюдента, $p = 0.0002$) у колонизированных грибом личинок по сравнению с контролем. Тренд к уменьшению зафиксирован для всех кислот кроме C17:0. Среди главных кислот наибольшее сокращение наблюдалось для линоленовой кислоты C18:3 (в 12 раз, тест Стьюдента, $p = 0.001$) и эйкозановой кислоты C20:0 (в 9.5 раз, тест Стьюдента, $p = 0.003$). Кислота C16:3 не детектировалась после колонизации. Содержание свободных жирных кислот в личинках до и после колонизации грибом приведено в таблице в Приложении 5 и на рис. 3.13.

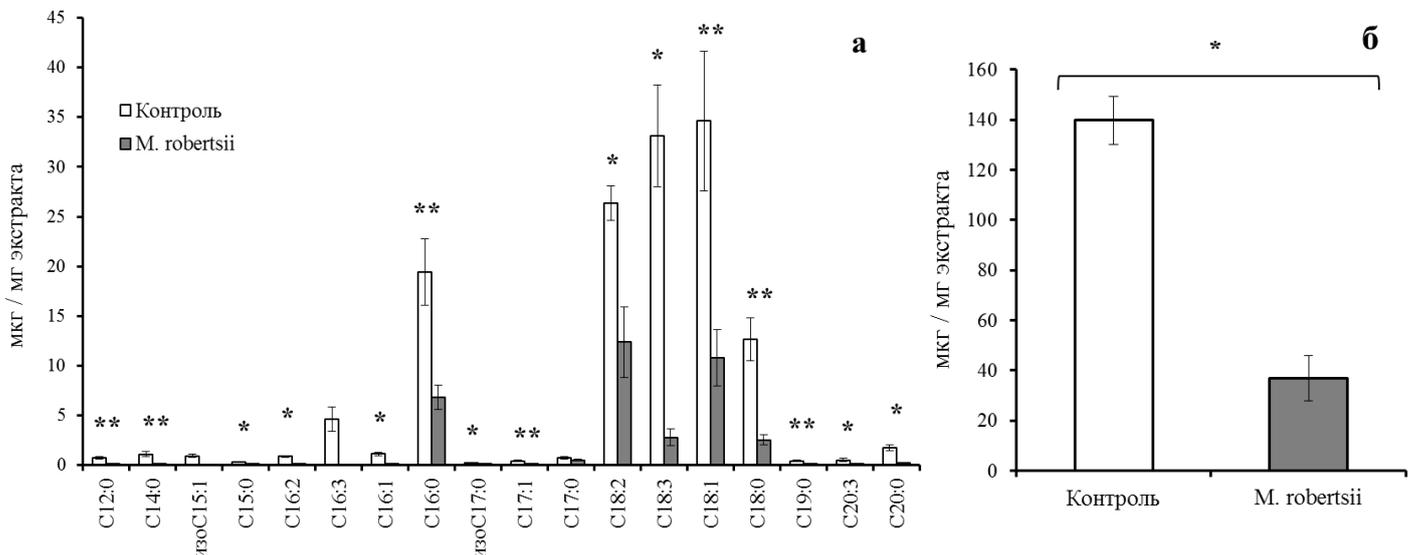


Рис. 3.13. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание свободных жирных кислот в экстрактах целого тела здоровых и колонизированных *M. robertsii* личинок колорадского жука; 4 биологических повторности, по 40 особей в каждой; значимые отличия *тест Стьюдента, **тест Манна-Уитни, $p < 0.05$

Общее содержание связанных жирных кислот в экстрактах личинок существенно не изменялось после колонизации *M. robertsii* (тест Манна-Уитни, $p = 0.3$) (рис. 3.14б), но содержание индивидуальных кислот изменялось по-разному. Так, содержания основных кислот C18:2 и C18:1 увеличивались в 1.9 раз (тест Стьюдента, $p = 0.005$) и 2.1 раза (тест Манна-Уитни, $p = 0.03$) соответственно. Количество кислот C16:3 и C18:3 сокращалось в 6 раз (тест Стьюдента, $p < 0.001$), и в 3 раза (тест Стьюдента, $p < 0.001$) соответственно. Содержание кислоты C20:0 уменьшалось в 2.2 раза в колонизированных личинках (тест Стьюдента, $p = 0.004$). Содержание кислот C16:0 и C18:0 существенно не изменялось после колонизации грибом. Содержание связанных жирных кислот в экстрактах здоровых и колонизированных *M. robertsii* личинках колорадского жука приведено в таблице в Приложении 6 и на рис. 3.14.

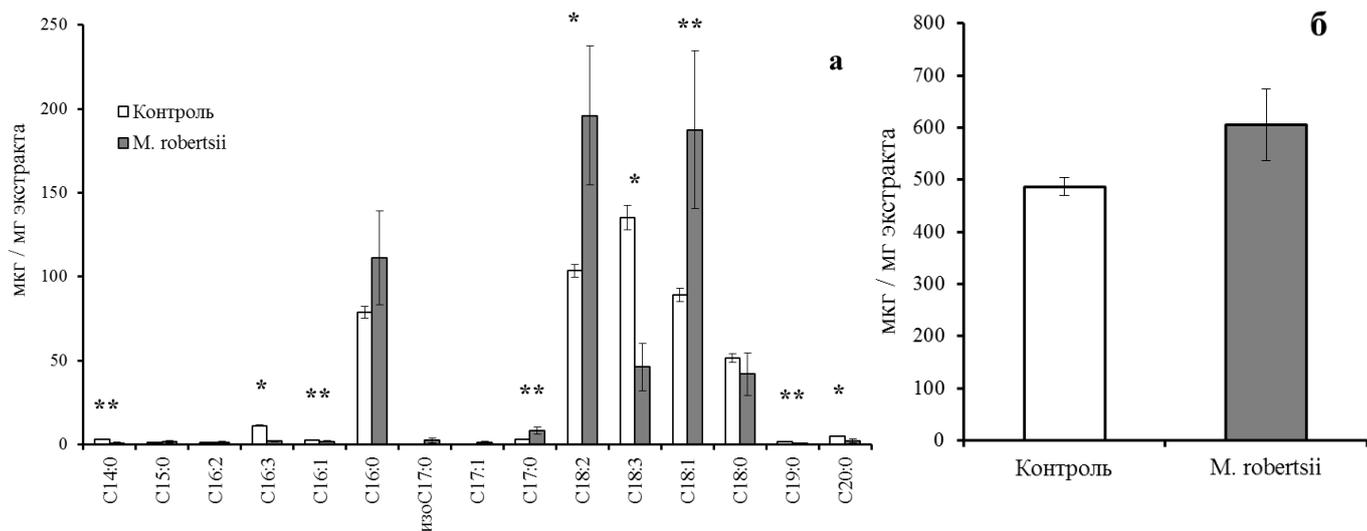


Рис. 3.14. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание связанных жирных кислот в экстрактах целого тела личинок колорадского жука до и после колонизации грибом *M. robertsii*; Использовано 4 биологических повторности, по 40 особей в каждой. Значимые отличия *тест Стьюдента, ** тест Манна-Уитни, $p < 0.05$

3.2.2. Липиды конидий гриба *M. robertsii*

В экстрактах конидий *M. robertsii*, сформировавшихся на личинках колорадского жука, идентифицированы только свободные и связанные жирные кислоты; углеводороды в экстрактах гриба отсутствовали. Доминирующими кислотами как в свободной, так и связанной формах были C16:0, C18:2 и C18:1 (рис. 3.15). Содержание идентифицированных кислот в конидиях приведено в таблице в Приложении 7 и на рис. 3.15.

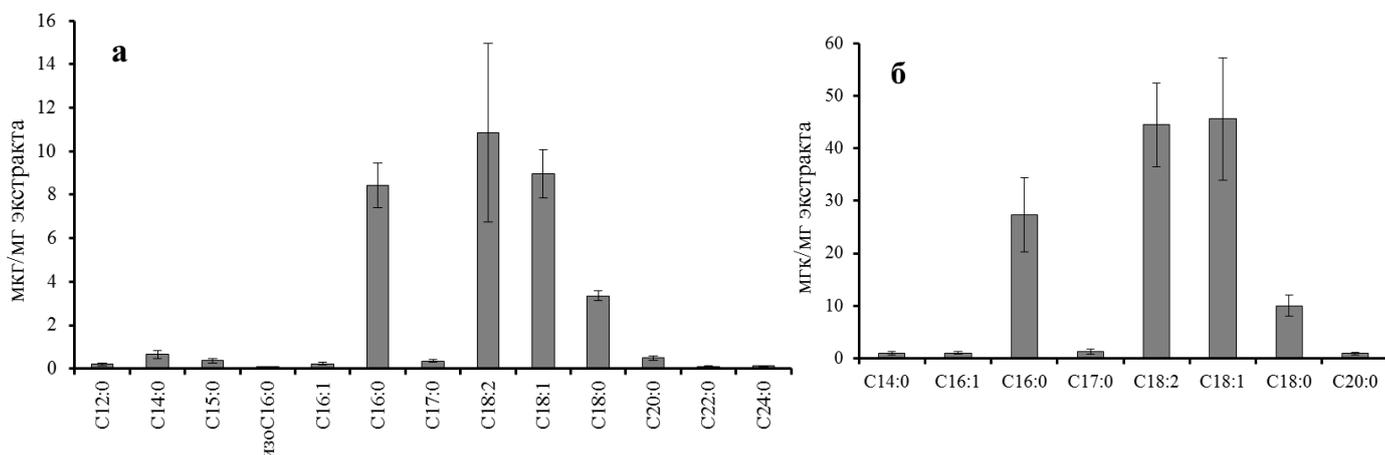


Рис. 3.15. Содержание свободных (а) и связанных (б) жирных кислот в экстрактах конидий *M. robertsii*, выращенных на личинках колорадского жука. Использовано 5 повторностей для свободных кислот и 4 повторности для связанных кислот, одна повторность = 0.2 г конидий

3.2.3. Изменение состава липидов личинных шкурок колорадского жука после обработки конидиями грибов

В липидах личинных шкурок личинок колорадского жука IV-го возраста идентифицированы предельные моно-, ди- и триметилразветвленные углеводороды состава C28-C33. Как и в экспериментах с целым телом, нами выявлено снижение содержания

углеводородов в шкурках после развития на них гриба *M. robertsii*. В частности, в обработанных грибом шкурках общее содержание углеводов уменьшалось в 2.0 раза по сравнению с контролем (тест Стьюдента, $p = 0.002$, Приложение 8, рис. 3.16б). Для большинства идентифицированных соединений наблюдались значимые отличия, кроме 13-метилгептакозана ($p=0.056$), 7-метилоктакозана ($p=0.08$) и 4- и/или 2-метилтриаконтана ($p=0.5$) (Приложение 8, рис. 3.16а). Наибольшее сокращение было зафиксировано для 2,10- и/или 2,18-диметилоктакозана (в 4.7 раз), 12-метилтриаконтана (в 3.9 раз) и 2,12- и/или 2,18-диметилтриаконтана (в 3.7 раз).

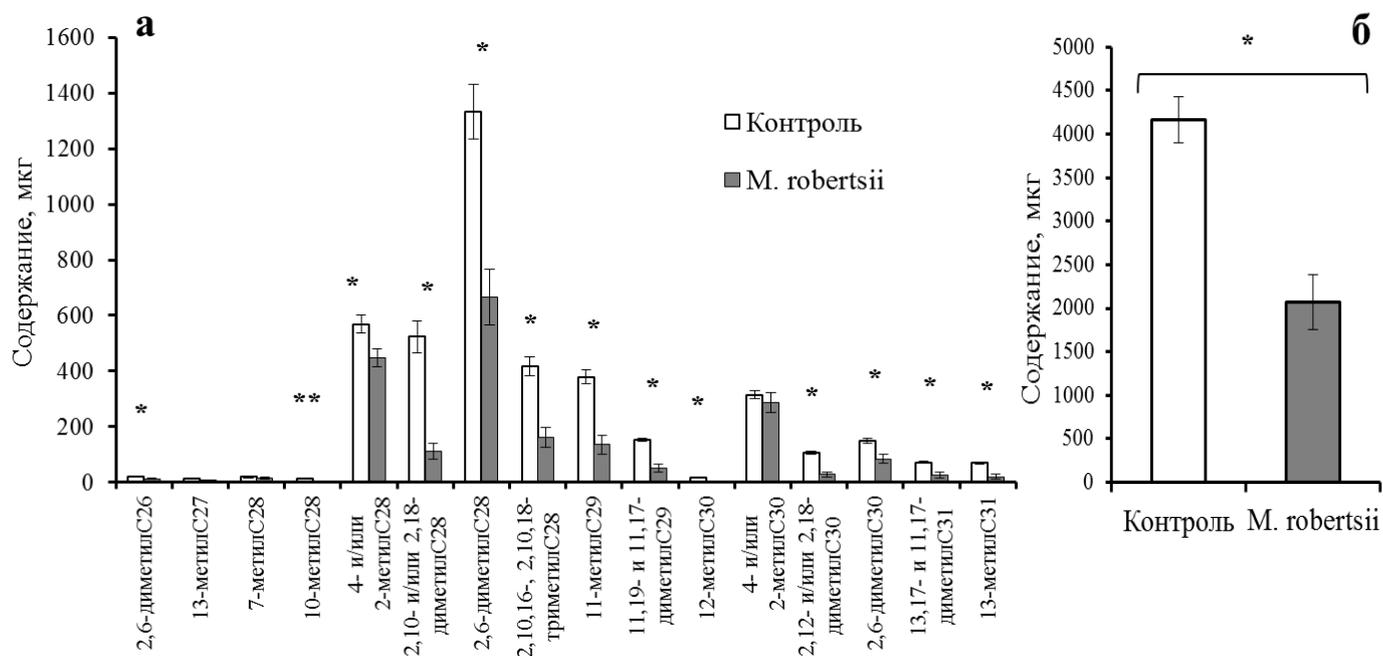


Рис. 3.16. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание углеводов в экстрактах личиночных шкурок колорадского жука после развития на них гриба *M. robertsii* и в контрольном варианте (обработка водой), использовано по 4 биологических повторности, по 80 шкурок в каждой. Значимые отличия: *тест Стьюдента, **тест Манна-Уитни, $p < 0.05$

В экстрактах личиночных шкурок также идентифицированы свободные (C14-C24) и связанные (C14-C20) жирные кислоты. Индивидуальное и суммарное содержание свободных кислот в шкурках не изменялось после развития на них *M. robertsii*. Среди индивидуальных связанных кислот содержание C16:0 существенно повышалось после развития гриба ($p = 0.01$), а содержание кислот C18:1, C18:0 и C20:0 повышалось на незначительном уровне ($p > 0.055$). При этом суммарное содержание связанных кислот не существенно изменялось после инкубации с грибом. Результаты идентификации и количественного содержания кислот приведены в таблицах в Приложениях 9 и 10 и на рис. 3.17 и 3.18.

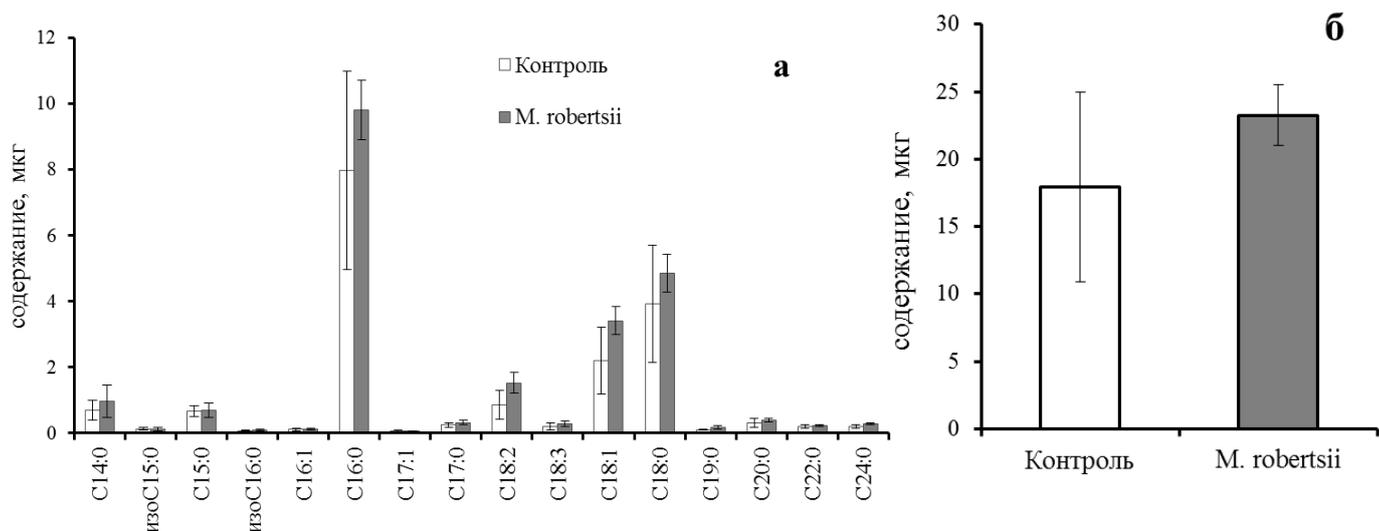


Рис. 3.17. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание свободных жирных кислот в экстрактах личиночных шкурок личинок колорадского жука после развития на них гриба *M. robertsii* и в контрольном варианте (обработка водой), использовано 4 биологических повторности, по 80 шкурок в каждой

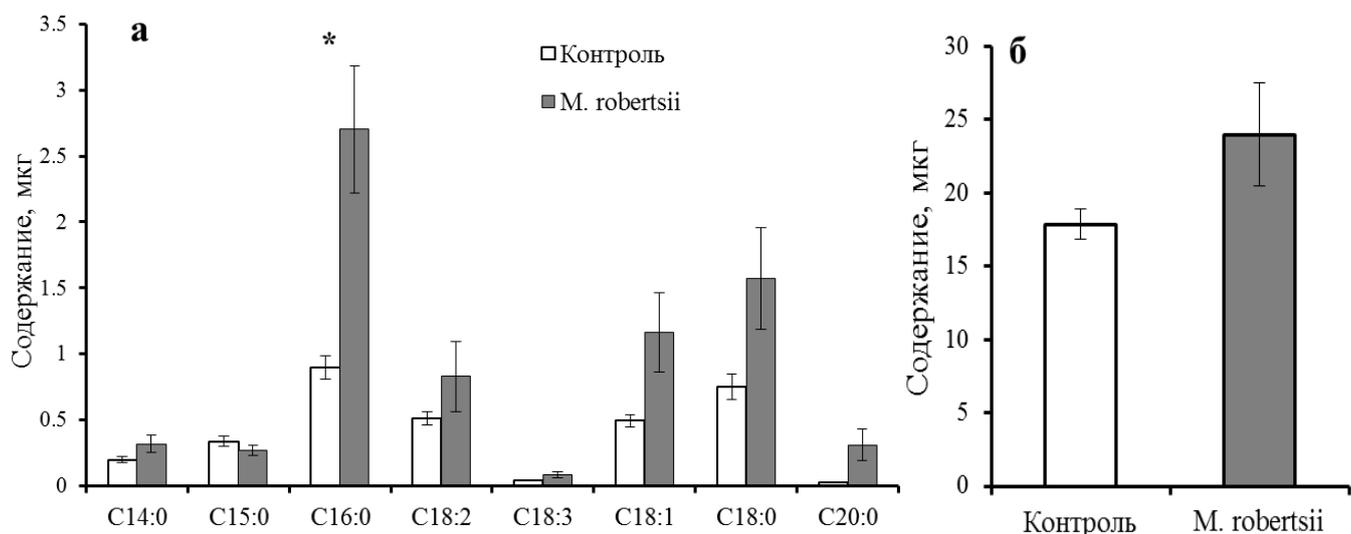


Рис. 3.18. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание связанных жирных кислот в экстрактах личиночных шкурок личинок колорадского жука после развития на них гриба *M. robertsii* и в контрольном варианте (обработка водой), использовано 4 биологических повторности, по 80 шкурок в каждой.

Значимые отличия: *тест Стьюдента, $p < 0.05$

3.2.4. Вирулентность гриба *M. robertsii*

Конидии *M. robertsii*, выращенные на картофельно-декстрозном агаре с добавлением кутикулярных липидов личинок колорадского жука, обладали более высокой вирулентностью по сравнению с конидиями, выращенными на той же среде, но без липидов (рис.3.19). Различия в полуплутальном времени выживаемости между вариантами составили одни сутки (лог-ранк тест, $p < 0.001$). Гибель в контроле не превышала 10%. Эксперимент повторен независимо 3 раза и результаты были совместимыми.

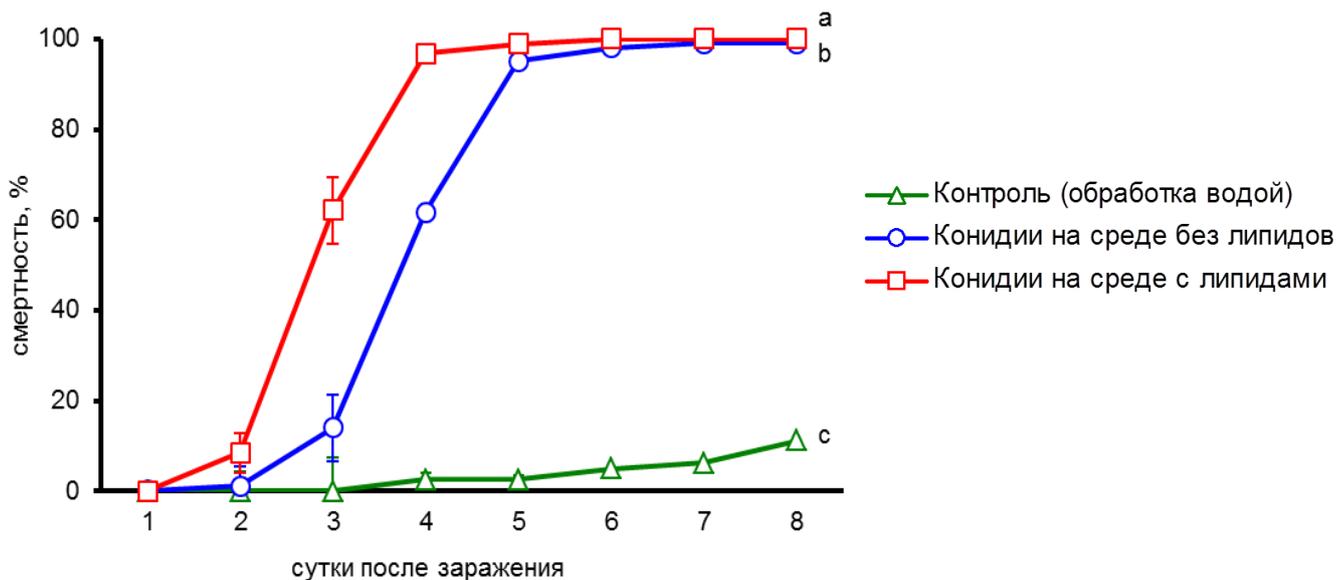


Рис. 3.19. Динамика смертности личинок колорадского жука, зараженных конидиями *M. robertsii*, выращенных на картофельном агаре с добавлением кутикулярных липидов и без них. Доза конидий для заражения – 5×10^6 конидий/мл. Использовано 10 повторностей, по 10 личинок в каждой. Разные буквы указывают существенные различия ($p < 0.001$) согласно анализу выживаемости (лог-ранк тест)

Таким образом, нами впервые показана утилизация грибом *M. robertsii* большинства метилразветвленных алканов личинок колорадского жука (рис. 3.12, 3.16). Данные, полученные из эксперимента с личиночными шкурками, подтверждают, что уменьшение содержания углеводов является следствием утилизации грибом, а не изменением метаболизма насекомого при инфекции.

Подобные результаты по уменьшению уровня кутикулярных *n*-алканов при грибной инфекции, вызванной *Metarhizium acridum*, получены на примере саранчи *S. gregaria* [92]. При инфицировании *B. bassiana* кукурузной огневки *Ostrinia nubilalis* выявлено значительное сокращение всех кутикулярных углеводов [93]. В ряде работ также показано, что энтомопатогенные грибы способны расти на среде с углеводами в качестве единственного источника углерода и утилизировать синтетические углеводороды состава C16-C31 [89, 90, 180] и углеводороды из кутикулы насекомых [89, 93]. Также показано, что у гриба *B. bassiana*, выращенного на среде с *n*-алканами, повышается вирулентность против фасолевой зерновки *Acanthoscelides obtectus* [91].

Суммарное содержание свободных жирных кислот в целом теле личинок колорадского жука значительно сокращалось после колонизации грибом. Подобные тенденции наблюдались и для других насекомых при протекании грибной инфекции. Так, при заражении грибом *Conidiobolus coronatus* самок таракана *Blatta orientalis* общее содержание свободных жирных кислот во внутренних липидах уменьшалось в 8 раз [94]. При заражении тем же грибом самцов кузнечика *Tettigonia viridissima* уровень свободных жирных кислот C16:0, C18:2, C18:1, C18:0 во внутренних липидах уменьшался в 8 раз, а в кутикуле уменьшался в 3.7 раза [94]. Возможно,

это связано с физиологическими изменениями насекомого, возникающими при микозах. Но также гриб может метаболизировать свободные кислоты в процессе роста. Так, грибы могут использовать свободные жирные кислоты в синтезе триглицеридов и фосфолипидов [9, 181,182]. Показано, что ферменты глицерол-3-фосфат ацилтрансфераза и фосфатидат ацилтрансфераза у *M. robertsii*, задействованные в синтезе этих соединений, определяют его вирулентность, способность к росту и спороношению [9, 181, 182]. Но также гриб может утилизировать свободные кислоты в процессе β -окисления [89].

Нами зафиксировано значительное сокращение свободных и связанных ненасыщенных жирных кислот в экстрактах целого тела личинок после заражения *M. robertsii*. Подобные результаты получены в работе [94] после инфицирования самок таракана *B. orientalis* грибом *S. coronatus*: на 10-й день инфекции во внутренних липидах содержание кислоты C16:1 уменьшалось в 6 раз, кислот C20:5, C20:4, C20:3, C20:2, C20:1 – от 9 до 17 раз, кислоты C20:0 – в 17 раз. Возможно, это связано с окислительным стрессом, который является характерным сопутствующим процессом при инфекциях у насекомых [183-189]. При окислительном стрессе повышается концентрация активных кислородных частиц (супероксиды-ионы, пероксид водорода, пероксиды липидов или соответствующие гидроксильные и пероксильные радикалы), которые могут повреждать ДНК, белки, липиды [190,191]. Среди липидов наибольшему пероксидному окислению подвержены полиненасыщенные жирные кислоты – длинноцепочечные кислоты более чем с двумя двойными связями [191]. Данный процесс может происходить как неферментативно, так и при помощи ферментов – циклооксигеназ, цитохромов P450, липоксигеназ [191]. Можно полагать, что при грибных инфекциях полиненасыщенные кислоты подвергаются пероксидному окислению и поэтому их концентрация сокращается.

Отдельно следует обсудить наблюдаемое уменьшение свободных и связанных кислот C20, как в нашем случае, так и в [94]. Из кислот с длиной цепи C20 синтезируется арахидоновая кислота. Она является предшественником простагландинов (и других эйкозаноидов) [192], соединений, модулирующих иммунный ответ. В ряде работ показана роль простагландинов в проведении иммунных реакций у насекомых при грибных инфекциях [193-196]. Таким образом уменьшение содержания кислот C20 может быть связано с синтезом простагландинов в процессе инфекции.

Нами выявлено увеличение содержание кислот C18:2 и C18:1 в связанном виде у личинок после их колонизации грибом *M. robertsii*. Могут быть разные объяснения данного эффекта. С одной стороны, гриб может синтезировать триглицериды *de novo* из утилизированных углеводов. Так, в [89] показано, что гриб *Metarhizium anisopliae* при выращивании на среде, обогащенной углеводородами, способен синтезировать ряд липидных

соединений, в том числе и триглицериды. Более того, при утилизации метилразветвленных углеводов выработка триглицеридов была выше, чем в случае линейных алканов.

Таким образом, нами впервые показано, что гриб *M. robertsii* утилизирует все эпикутикулярные метилразветвленные алканы личинок колорадского жука при развитии грибной инфекции. Кроме того, при развитии микоза происходит снижение содержания свободных жирных кислот в теле личинок, что может свидетельствовать об изменении их метаболизма в насекомом-хозяине под воздействием инфекции или прямой утилизации грибом. Питание *M. robertsii* на экстрактах кутикулы колорадского жука с преобладанием углеводов существенно повышает его вирулентные свойства. Эти и ранее полученные данные [107, 108] 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.

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

В литературе нет примеров работ о том, как связаны составы эпикутикулярных липидов насекомых из разных мест обитания с восприимчивостью к энтомопатогенным грибам. Ранее было показано, что при одинаковых гигротермических условиях саранчовые рода *Calliptamus* более восприимчивы к грибным патогенам *Metarhizium* и *Beauveria*, по сравнению с *Locusta migratoria* [20]. Наша гипотеза заключалась в том, что насекомые из аридных стадий (*Calliptamus*) обладают особой кутикулярной липидной композицией, которая предотвращает обезвоживание, но в то же время делает их более восприимчивыми к грибным патогенам. Гипотеза была протестирована на паре видов саранчовых с разными гигротермическими предпочтениями. В качестве объектов были использованы мезоксерофильный вид азиатская саранча (*L. migratoria*), населяющий тростниковые станции близ водоемов, и вид, населяющий широкий диапазон стадий и тяготеющий к сухим полынным степям, итальянский прус (*Calliptamus italicus*) [18,19]. Был проведен сравнительный анализ углеводов и жирных кислот, которые являются основными компонентами эпикутикулы нимф *L. migratoria* и *C. italicus*, методом ГХ/МС. Кроме того определены уровни адгезии конидий *M. robertsii* к кутикуле обоих видов, уровни прорастания конидий на кутикулярных экстрактах и оценка динамики смертности в ответ на заражение грибом. Следует отметить, что в литературе есть примеры работ по анализу кутикулярных липидов азиатской саранчи [8, 135, 140], при этом идентификация кутикулярных липидов итальянского пруса нами проведена впервые.

3.3.1. Кутикулярные липиды

3.3.1.1. Углеводороды

В исследуемых экстрактах были идентифицированы насыщенные нормальные, моно-, ди- и триметилразветвленные углеводороды состава C₂₅-C₄₁. Всего идентифицировано 137 соединений: 63 углеводорода в эпикутикуле перелетной саранчи и 74 углеводорода в эпикутикуле итальянского пруса. Хроматограммы углеводородных профилей эпикутикулярных экстрактов нимф *C. italicus* и *L. migratoria* представлены на рис. 3.20 и в Приложении 11 и 12. Идентифицированные углеводороды и их количественное содержание в пересчете на массу экстракта и на вес насекомых приведены в таблицах в Приложениях 13 и 14.

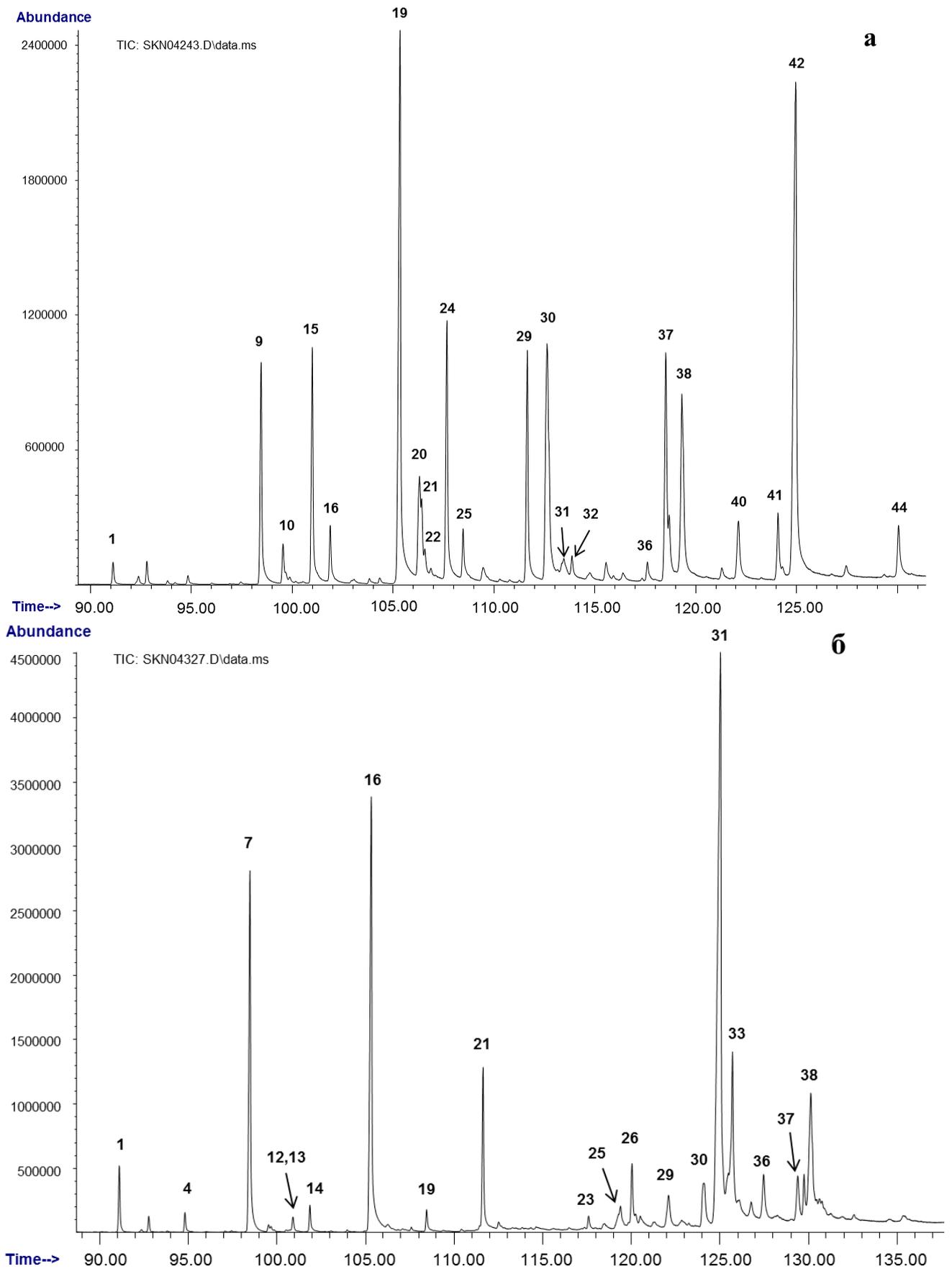


Рис. 3.20. Хроматограммы углеводородных профилей *L. migratoria* (а) и *C. italicus* (б). Номера пиков соответствуют таблицам в Приложениях 13 и 14. Хроматограммы минорных пиков приведены в Приложении 11 и 12.

Общее содержание углеводов не отличалось существенно между исследуемыми видами как по их доле в экстракте, так и в пересчете на вес насекомых: 784.9 ± 61.6 мкг/мг экстракта и 477.2 ± 39.7 мкг/г насекомого для азиатской саранчи и 790.9 ± 63.6 мкг/мг экстракта и 484.2 ± 32.6 мкг/г насекомого для итальянского пруса (тест Стьюдента, $p > 0.8$). Доля углеводов от массы экстракта составила 78-79% у обоих видов. Однако составы углеводородных композиций *L. migratoria* и *C. italicus* были различными (рис. 3.21, Приложение 13 и 14). Углеводородный профиль *C. italicus* был значительно сдвинут в более длинноцепочечную область по сравнению с *L. migratoria* (рис. 3.21,а). Так, в относительно легкоцепочечной области (С25-С29) отличий в содержании углеводов не наблюдалось. В области среднецепочечных углеводов (С30-С34) содержание у итальянского пруса было в 5.9 раза ниже, чем у *L. migratoria* (тест Стьюдента, $p < 0.0001$). Содержание длинноцепочечных углеводов (С35-С39) у итальянского пруса было в 1.9 раза выше, чем у азиатской саранчи (тест Стьюдента, $p < 0.001$). Кроме того, у итальянского пруса были обнаружены в следовых количествах углеводороды состава С40, С41, которые не были обнаружены у *L. migratoria* (Приложение 14).

Композиции обоих видов отличались по степени разветвленности углеводородной цепи (рис. 3.21,б). Качественно, липидная композиция эпикутикулы итальянского пруса характеризовалась более узким спектром монометилалканов, но более широким спектром ди- и триметилалканов (Приложение 14). Количественно (мкг/мг экстракта), содержание *n*-алканов было выше у итальянского пруса в 1.2 раза но лишь на несущественном уровне (тест Стьюдента, $p = 0.18$). Однако отметим, что при оценке доли *n*-алканов только внутри группы углеводов эти различия были существенными (тест Манна-Уитни, $p = 0.008$). Основными *n*-алканами в обоих видах были *n*-С29 и *n*-С27, при этом содержание *n*-С29 не отличалось существенно между видами, а содержание *n*-С27 у итальянского пруса было в 2 раза выше, чем у азиатской саранчи (тест Стьюдента, $p < 0.001$, рис. 3.21).

Содержание монометилалканов у *C. italicus* было в 7.2 раза ниже, чем у азиатской саранчи (тест Стьюдента, $p < 0.0001$) в мкг/мг экстракта. Основными монометилалканами у *L. migratoria* были изомеры с длиной цепи С31, которые у итальянского пруса были в следовых количествах. Основными монометилалканами у итальянского пруса были изомеры с длиной цепи С35, и их содержание было в 1.8 раз выше, чем у *L. migratoria* (тест Манна-Уитни, $p = 0.013$).

У итальянского пруса обнаружено повышенное в 1.6 раз содержание диметилразветвленных углеводов в мкг/мг экстракта (тест Стьюдента, $p = 0.002$), по сравнению с азиатской саранчой. Основными диметилалканами у обоих видов были алканы с длиной главной цепи С35, причем у итальянского пруса содержание было в 1.8 раз выше

(тест Стьюдента, $p < 0.001$). Кроме того, у *C. italicus* обнаружены в небольшом количестве триметилалканы, отсутствующие в азиатской саранче (Приложение 14, рис. 3.21в). Аналогичные эффекты как для индивидуальных соединений, так и для групп углеводородов с разными длинами цепей и количеству метильных групп получены при оценке относительного количества алканов в мкг/г насекомых (Приложение 15).

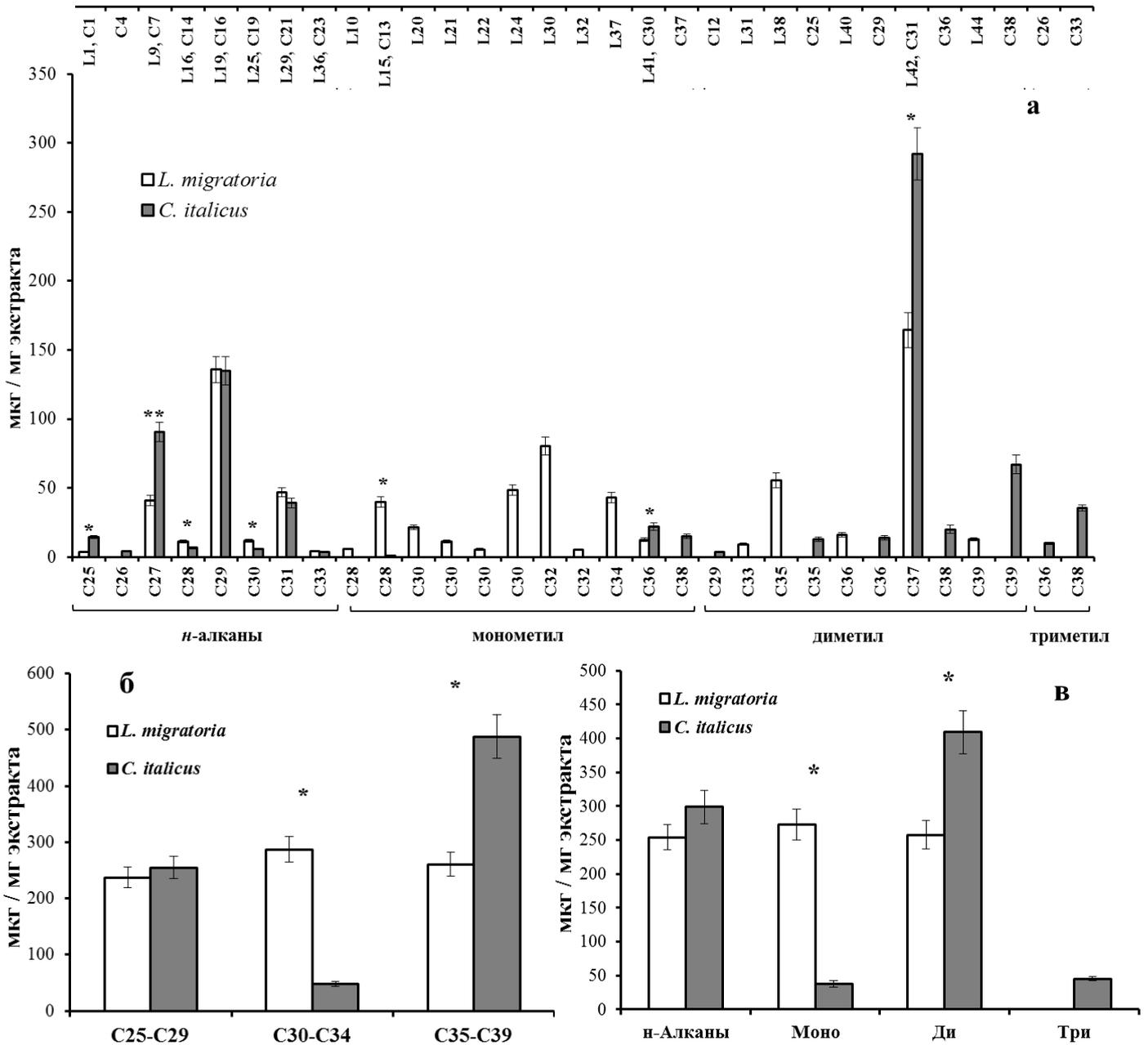


Рис. 3.21. Содержание углеводородов в эпикуткулярном экстракте нимф *C. italicus* и *L. migratoria*. а – распределение индивидуальных компонентов; б – распределение по количеству атомов углерода; в – распределение по количеству метильных групп; на верхней оси указаны номера соединений (*L* для *L. migratoria* и *C* для *C. italicus*), соответствующих таблицам в Приложениях 13 и 14, на нижней оси указано общее количество атомов углерода. Использовано 6 повторностей по 80 особей в каждой. Значимые различия между видами: *тест Стьюдента, ** тест Манна-Уитни, $p < 0.05$. В случаях отсутствия компонента в одном из вариантов сравнения не проводили

3.3.1.2. Жирные кислоты

В эпикутикуле саранчовых идентифицированы насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, доля которых не превышала 3% от массы эпикутикулярных экстрактов. Всего обнаружено 22 кислоты, 16 кислот у *L. migratoria* и 6 кислот у *C. italicus*. Установлено, что у итальянского пруса жирнокислотный спектр гораздо уже, чем у азиатской саранчи (Приложения 16 и 17, рис. 3.22). Так, в экстракте эпикутикулы азиатской саранчи идентифицированы жирные кислоты состава C14-C34, из которых основными были кислоты C16:0, C18:3, C28:0 и C30:0. У итальянского пруса были идентифицированы только жирные кислоты C16-C20, причем основной была кислота C16:0. Суммарное содержание жирных кислот у итальянского пруса и азиатской саранчи составляло 14.1 ± 1.7 мкг / мг экстракта и 21.1 ± 2.49 мкг / мг экстракта соответственно (тест Стьюдента, $p = 0.041$) и 8.62 ± 0.93 мкг / г насекомого и 12.9 ± 1.5 мкг / г насекомого соответственно (тест Стьюдента, $p = 0.036$). Относительное содержание ненасыщенных кислот по отношению к общему содержанию липидов составило $0.63 \pm 0.10\%$ для *L. migratoria* и $0.81 \pm 0.07\%$ для *C. italicus*, отличия были незначимы (тест Стьюдента, $p = 0.18$).

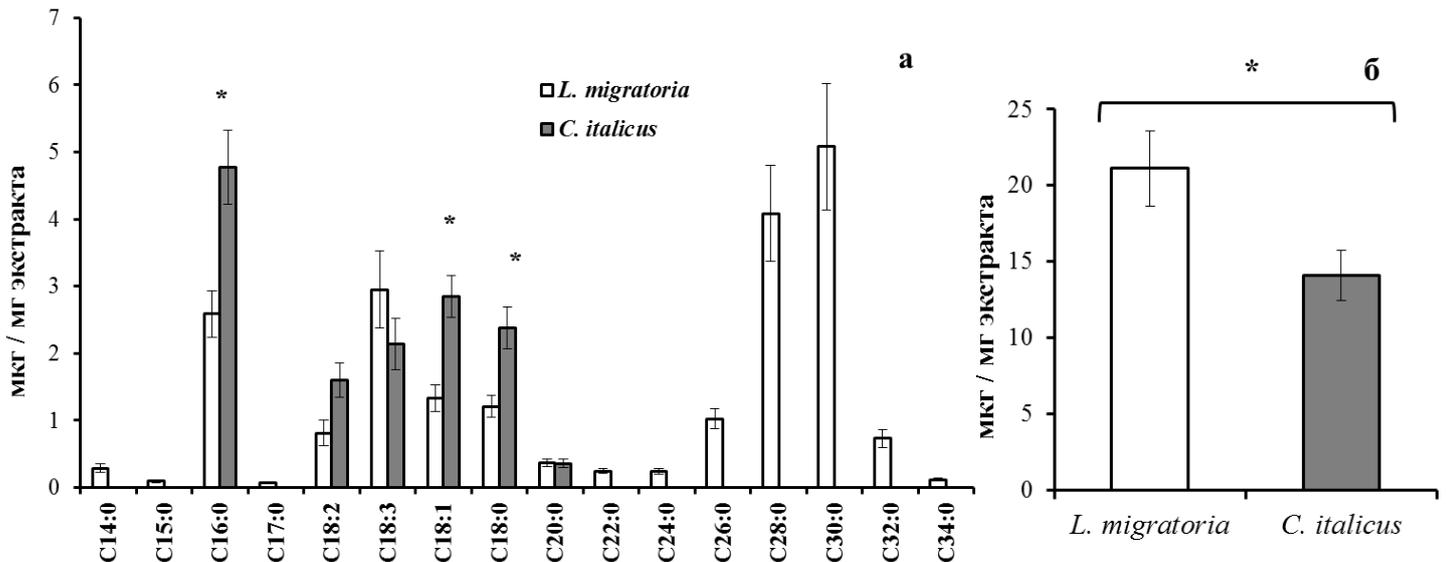


Рис. 3.22. Индивидуальное (а) и суммарное (б) содержание жирных кислот в эпикутикуле нимф *C. italicus* и *L. migratoria*. Использовано 6 повторностей по 80 особей в каждой. * указывает значительные различия между видами (тест Стьюдента, $p < 0.05$). В случаях отсутствия компонента в одном из вариантов сравнения не проводили

3.3.1.3. Кетоны

В эпикутикуле *C. italicus* были обнаружены длинноцепочечные кетоны, составляющие гомологический ряд C34-C40, всего 12 кетонов. Их содержание составило 50.8 ± 3.6 мкг/мг экстракта, что составляет 5% от массы экстракта (Приложение 18). Примеры масс-

хроматограмм и масс-спектров идентифицированных структур приведены в Приложениях 19-21. В эпикутикуле *L. migratoria* кетоны не обнаружены.

3.3.2. Восприимчивость саранчовых к *M. robertsii*

Показано, что нимфы *L. migratoria* более устойчивы к грибу *M. robertsii*, чем *C. italicus*. Полулетальное время (LT₅₀) после обработки нимф конидиями составило 12 ± 0.06 суток для *L. migratoria* и 9 ± 0.06 суток для *C. italicus* (лог-ранк тест: $\chi^2 = 55.2$, $p < 0.0001$, рис. 3.23). Смертность инфицированных насекомых значительно отличалась от соответствующих контрольных насекомых ($\chi^2 > 38.4$, $p < 0.0001$). Схожий эффект наблюдался после обработки нимф конидиями *B. bassiana* (рис. 3.23б). Полулетальное время было короче для *C. italicus* по сравнению с *L. migratoria* (лог-ранк тест: $\chi^2 = 6.8$, $p = 0.009$). Итоговая гибель на 12 сутки достигала 100% у *C. italicus* и 90% у *L. migratoria* соответственно. Различия в смертности между необработанными (контрольными) насекомыми были незначительными: 3% у *C. italicus* и 10% у *L. migratoria*.

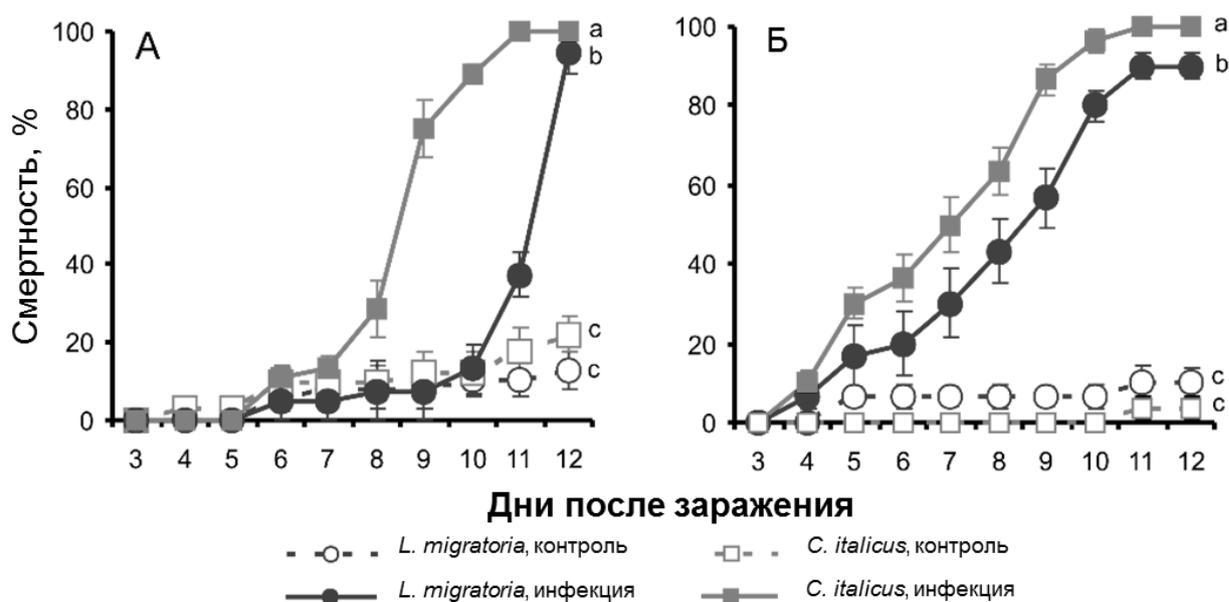


Рис. 3.23. Динамика смертности нимф *L. migratoria* и *C. italicus* после обработки конидиями *M. robertsii* (А) или *B. bassiana* (Б) (10^7 конидий/мл). Использовано 4 повторности по 10 особей в каждой. Разные буквы указывают значимые различия в динамике смертности (лог-ранк тест: $\chi^2 > 6.8$, $df = 1$, $p < 0.009$)

3.3.3. Адгезия и прорастание конидий *M. robertsii*

Количество адгезированных конидий *M. robertsii* к кутикуле нимф *C. italicus* было в 3.3 раза выше, чем к кутикуле *L. migratoria*, и различия были статистически значимыми (тест Стьюдента, $p = 0.002$, рис.3.24а). Оба экстракта *C. italicus* и *L. migratoria* стимулировали прорастание конидий на агарозе (7.5-8-кратно по сравнению с обработкой чистыми растворителями, тест Стьюдента, $p < 0.006$, рис. 3.24б). Однако не было обнаружено существенных различий в уровне прорастания конидий на экстрактах, полученных от *C. italicus* либо *L. migratoria* (тест Стьюдента, $p = 0.73$).

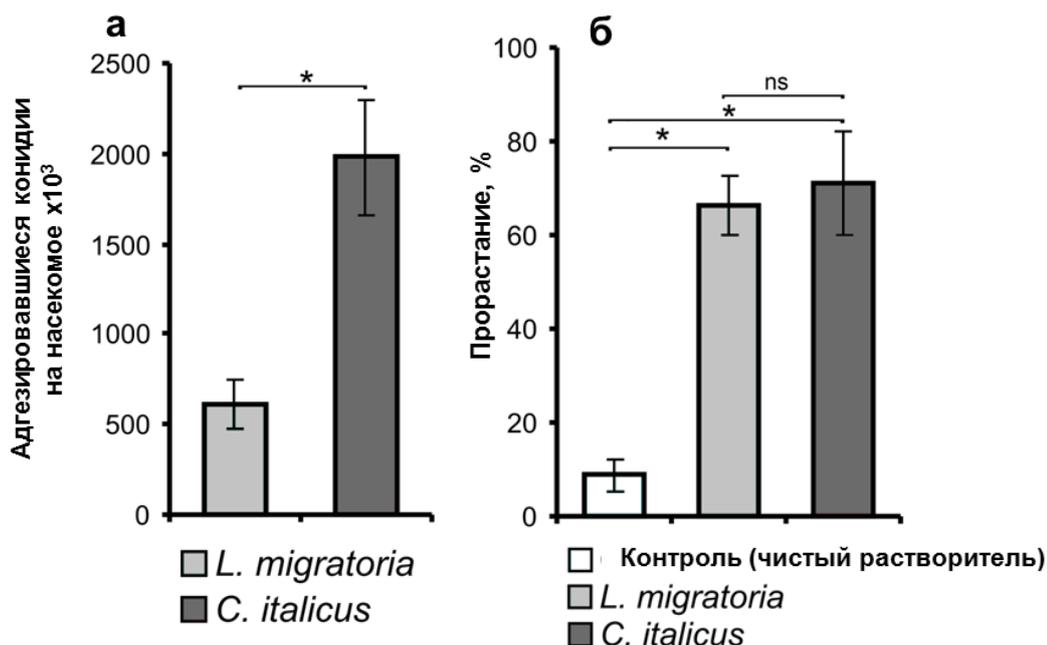


Рис. 3.24. Количество адгезировавшихся конидий *M. robertsii* к кутикуле *L. migratoria* и *C. italicus* после обработки суспензией, содержащей 10^8 конидий/мл (а) и прорастание конидий на эпикутикулярных экстрактах *L. migratoria* и *C. italicus*, нанесенных на поверхность агарозы (б). Использовано 8 биологических повторностей по 4 особи в каждой для адгезии и 3 биологических повторностей по 10 полей зрения в каждой для прорастания. * указывает значительные различия между видами (тест Стьюдента, $p < 0.003$); ns: незначительные различия

Таким образом, нами выявлены значительные различия в композициях кутикулярных липидов нимф *L. migratoria* и *C. italicus*, которые, по всей вероятности, играют роль в приспособлении к разным местообитаниям и в устойчивости к грибным инфекциям. Главные композиционные различия эпикутикулы исследуемой пары видов – это смещение в сторону более длинноцепочечных и более разветвленных углеводов у *C. italicus* по сравнению с *L. migratoria*, а также несколько большая доля *n*-алканов у *C. italicus*. Различия в липидных композициях коррелируют с более высоким уровнем адгезии конидий к кутикуле и более высокой восприимчивостью к энтомопатогенным грибам у *C. italicus* по сравнению с *L. migratoria*.

Мы полагаем, что указанные различия в липидных композициях могут быть связаны с адаптациями к разным гидротермическим режимам. Известно, что в ряду углеводов температура плавления уменьшается в следующем порядке: *n*-алканы, монометилалканы, диметилалканы, алкены, при этом молекулярный вес оказывает менее значимый эффект на точку плавления [32,34]. С точки зрения молекулярной структуры эпикутикулы *n*-алканы формируют более плотную кристаллическую упаковку, что обеспечивает надежный барьер от потери воды. Включение в структуру эпикутикулы метилразветвленных углеводов нарушает упорядоченность упаковки и приводит к повышению проницаемости [38]. Однако кутикулярные липиды представляют собой сложную многокомпонентную смесь, и плавление происходит в определенном диапазоне температур [32]. Связи между климатическими

предпочтениями и композицией кутикулярных липидов у насекомых показаны во многих работах [16, 45, 46]. Общие тренды заключаются в увеличении содержания линейных и метилразветвленных предельных углеводов и увеличении длины углеводородной цепи у насекомых из засушливых стадий, что согласуется с нашими данными. Локи и Ораха [8] считают, что защиту от обезвоживания обеспечивают преимущественно *n*-алканы, а метилразветвленные компоненты обеспечивают текучесть углеводородной матрицы, которая важна для облегчения секреции липидов через поровые каналы, равномерного распределения полярных компонентов в липидной матрице, равномерного обволакивания поверхности тела насекомого и поддержания постоянства липидного слоя, в частности, при изменении температур в течение суток. По всей вероятности, большее содержание ди- и триметилалканов у итальянского пруса является адаптацией к резким колебаниям температур в аридных условиях.

Локи и Ораха [8] проводили сравнительный анализ кутикулярных липидов взрослых особей перелетной саранчи *L. migratoria migratoriodes* и более ксерофильного вида пустынной саранчи *S. gregaria*. Авторы считают, что повышенное содержание *n*-алканов у *S. gregaria* является адаптацией к более аридному пустынному климату, а ди- и триметилалканы в эпикутикуле *S. gregaria* расширяют диапазон плавления смеси углеводов, что обеспечивает постоянство липидной матрицы в условиях больших колебаний температур в течение суток в аридном климате. Это поддерживает нашу гипотезу о том, что сдвиг в сторону диметилалканов и наличие триметилалканов у *C. italicus* является приспособлением к флуктуациям температур в более аридных местах обитания. Мы также полагаем, что сдвиг в более длинноцепочечную область по общему количеству атомов углерода у *C. italicus* может компенсировать высокую долю разветвленных углеводов для повышения вязкости и температуры плавления, что обеспечивает более высокую защиту от обезвоживания.

Помимо этого, возможно, что метилразветвленные углеводороды итальянского пруса задействованы во внутривидовой коммуникации для образования кулиг. Так, в [113] показано, что у таракана *Blattella germanica* кутикулярные углеводороды являются феромонами агрегации личинок. Основными углеводородами *B. germanica* были *n*-нонакозан, 9-,11-,13- и 15-метилнонакозан, 5- метилнонакозан, 11,15- и 13,17-диметилнонакозан, 3-метилнонакозан, 5,9- и 5,11-ди метилнонакозан, 3,7-, 3,9- и 3,11- диметилнонакозан. Подобный результаты был получен для четырех других видов тараканов *Periplaneta* [114], основными углеводородами которых были: у *P.americana* 6,9-гептакозациен, у *P. brunnea* и *P. fuliginosa* 13-метилпентакозан, у *P. australasiae* трикозен и 13-метилпентакозан у самцов и самок соответственно. В работе [115] показано, что именно кутикулярные углеводороды пустынной саранчи *S. gregaria* участвуют в коммуникации при переходе от одиночной формы к стадной.

В идентифицированных углеводородных композициях саранчовых нами обнаружена связь между количеством метильных групп и длиной главной цепи. У обоих видов ближняя область (C25-C29) преимущественно представлена *n*-алканами, средняя область (C30-C34) – преимущественно моноалканами, а дальняя область (C35-C39) – диметилалканами и триметилалканами у итальянского пруса. Такая же тенденция наблюдалась и в работах по *L. migratoria* и *S. gregaria* [8, 135, 140, 141]. По всей видимости, молекулярная масса и степень разветвления не являются независимыми параметрами при формировании композиций эпикутикулярных липидов. Менцель и соавторы [16] считают, что, совместное присутствие разных типов структур не случайно, если они синтезируются одними или разными биохимическими путями, но также, возможно, есть ограничения на одновременный синтез разных типов углеводов. Чан и Кэрролл [52] утверждают, что из-за того, что кутикулярные липиды насекомых синтезируются по общим биохимическим путям с использованием ацетил-СоА, возможно, что изменения в синтезе одного типа кутикулярных углеводов ведет к синтезу других углеводов, которые участвуют в химической коммуникации и/или защите от обезвоживания. По-видимому, есть общий биохимический механизм, регулирующий длину цепи в зависимости от количества метильных групп, и он у исследуемых видов работает в противоположные стороны: у итальянского пруса выше содержание длинноцепочечных диметилалканов, у азиатской саранчи – среднецепочечных монометилалканов. Помимо этого, у обоих видов основными метилразветвленными и линейными углеводородами были структуры с нечетной главной углеродной цепью, синтезируемые из ацетил-СоА. Содержание таковых у *L. migratoria* и *C. italicus* составляло $95.0 \pm 0.1\%$ и $93.8 \pm 0.3\%$ от кутикулярных углеводов соответственно. Такая тенденция наблюдалась и в других работах по кутикулярным углеводородам саранчовых [8, 135, 140, 141].

Для жирных кислот у азиатской саранчи спектр сдвинут в более длинноцепочечную область и помимо средних цепей C14-C20 были обнаружены кислоты с длинными цепями – C22-C34. У итальянского пруса идентифицированы только кислоты C16-C20. Это также согласуется с исследованиями по имаго *L. migratoria* и *S. gregaria*. Показано, что в крыльях *L. migratoria* доминируют длинноцепочечные кислоты C28-C30 [136], тогда как у *S. gregaria* доминируют C14:0, C16:0, C18:0 [137]. В предотвращении обезвоживания для жирных кислот наблюдаются схожие закономерности по степени ненасыщенности, что и для углеводов [8,137]. Локи и Ораха [8] считают, пониженное содержание полиненасыщенных жирных кислот у *S. gregaria* также является механизмом защиты от обезвоживания при высоких температурах окружающей среды. Однако доля жирных кислот в исследуемых нами образцах была низкой – 1.5-2.7%, поэтому можно предполагать, что они не играют ведущую роль в устойчивости к обезвоживанию или восприимчивости к патогенам.

В эпикутикуле итальянского пруса идентифицирован ряд кетонов с длиной главной цепи C34-C40 и положением карбонильной группы у атомов углерода C9-C13. Известно, что у некоторых видов насекомых в кутикуле присутствуют кетоны. Так, в кутикуле самок таракана *B. germanica* обнаружены 3,11-диметилнонакозанон-2 и 3,11-диметилгептакозанон-2, выполняющие роль контактных феромонов в половом распознавании [197 - 199]. Помимо этого у мухи *Musca domestica* был идентифицирован кетон с карбонильной группой в середине цепи – (Z)-14-трикозенон-10, также задействованный в половом распознавании [200]. Не исключено, что у итальянского пруса кетоны так же задействованы в коммуникационных взаимодействиях.

Помимо температуры плавления липидных компонентов важным параметром в защите насекомых от потери воды может являться уровень гидрофобности этих компонентов. Показателем гидрофобности углеводородов может служить отношение растворимости в октанолу к растворимости в воде – коэффициент распределения октанол-вода ($\log K_{ow}$). Согласно [201] в ряду низших *n*-алканов $\log K_{ow}$ увеличивается с увеличением длины углеродной цепи, но уменьшается при переходе от линейных алканов к разветвленным. При этом важно, что уменьшение гидрофобности при переходе к разветвленным алканам вносит не такой большой вклад по сравнению с увеличением гидрофобности при увеличении углеродного числа [201].

Нами установлен более высокий уровень адгезии конидий к кутикуле итальянского пруса по сравнению с азиатской саранчой, что может быть связано с углеводородной композицией кутикулы. Можно полагать, что более длинноцепочечные углеводороды в кутикуле итальянского пруса определяют более высокую гидрофобность и, соответственно, более высокий уровень адгезии конидий *M. robertsii*.

Мы показали, что оба кутикулярных экстракта *L. migratoria* и *C. italicus* стимулировали прорастание конидий *M. robertsii* на агарозе. Ранее также было показано, что аутентичные углеводороды или экстракты, содержащие преимущественно углеводороды (линейные или разветвленные) стимулируют прорастание разных видов *Metarhizium* [92, 107, 108]. Однако мы не увидели существенных различий в уровне прорастания конидий на экстрактах двух видов саранчовых. Это может свидетельствовать о том, что именно изменение уровня адгезии вносит вклад в повышенную восприимчивость *C. italicus* к грибам.

Необходимо отметить, что *S. gregaria*, близкая по композиционному составу к кутикулярным липидам *C italicus*, также была более восприимчива к аскомицетам *M. robertsii*, *B. bassiana* и *B. brongniartii* по сравнению с *L. migratoria* [142]. В целом ксерофильные виды *Mioscirtus wagneri*, *Calliptamus barbarus* и комплекс видов *Dociostaruini* были более восприимчивы к грибам *Metarhizium* и *Beauveria*, чем более мезофильные *L. migratoria* и *Mecostethus alliaceus* при лабораторных тестированиях в одинаковых условиях температуры и

влажности [20]. Сходные данные также получены в экспериментах в полевых условиях на *L. migratoria* и *Cryptocatantops haemorrhoidalis* после обработки конидиями или погруженными спорами *Metarhizium acridum* [202]. Физиологические и эволюционно-экологические механизмы высокой восприимчивости ксерофилов к грибам недостаточно поняты. Можно предполагать, что поскольку сухие и жаркие местообитания неблагоприятны для грибов, то ксерофильные саранчовые редко сталкиваются с грибными инфекциями и, соответственно, не нуждаются в противогрибных механизмах защиты [20, 142]. Главная задача ксерофилов – это защита от обезвоживания, а не от грибных патогенов, поэтому они могут позволить себе «гостеприимную» для грибов кутикулу. Мезофильные же виды имеют более близкие гигротермические предпочтения с энтомопатогенными грибами, и, вероятно, в процессе эволюции выработали защитные механизмы, определяющие их устойчивость к патогенам. Поэтому их кутикула может быть менее гидрофобной и, соответственно, чувствительность к грибам более низкой.

3.4. Установление химического строения метилразветвленных алканов в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях эпикутикулярных липидов

Эпикутикула насекомых является сложной многокомпонентной смесью близких по строению и физико-химическим свойствам метилразветвленных изомеров. Зачастую это приводит к их недостаточному хроматографическому разделению. Установление строения осложняется еще и тем, что данные по длинноцепочечным метилразветвленным алканам практически отсутствуют в масс-спектральных библиотеках. Метод ГХ/МС является оптимальным для определения химического строения метилразветвленных углеводородов. При этом режим линейного программирования температуры позволяет достичь оптимального разделения компонентов, и все целевые пики и реперные *n*-алканы выходят в одной температурной области – в области линейного поднятия температуры, что важно для корректного расчета индексов удерживания. Следует отметить, что при хроматографическом анализе очень сложных смесей метилразветвленных алканов вряд ли можно подобрать такой режим программирования температуры, который был бы оптимальным для разделения всех изомерных компонентов [122].

Для установления химического строения метилразветвленных алканов была использована схема, предложенная Нельсоном и соавторами [6], которая включала: сравнение рассчитанных линейных индексов удерживания (ЛИУ) с литературными индексами для метилразветвленных углеводородов насекомых; анализ характеристических ионов в масс-спектрах, образующихся при распаде молекулы в местах разветвления углеродной цепи; проверку предполагаемой структуры на «биохимическую осуществимость» с учетом данных по биосинтезу метилразветвленных углеводородов насекомых [1, 6, 173, 174].

3.4.1. Анализ пиков из хроматографических профилей эпикутикулярных липидов

В качестве примера приведем применение данной схемы для установления состава и химического строения соединения пика №9 хроматографического профиля куколок колорадского жука (рис. 3.5). Рассчитанный ЛИУ для данного пика составляет 2931. В масс-спектре наблюдается молекулярный ион с m/z 422, следовательно брутто-формула данного углеводорода – $C_{30}H_{62}$. Согласно литературным данным наблюдаемому значению ЛИУ соответствуют внутренне разветвленные монометилалканы с длиной главной цепи C29: 2932 – 11-метилнонакозан [6], 2934.3 – 11-метилнонакозан [169], 2936 – 11- или 13-метилнонакозан [118]. В масс-спектре наблюдаются характеристичные ионы с m/z 168/169 и 280/281; ионы с m/z 168/169 соответствуют фрагменту C12, ионы с m/z 280/281 – фрагменту C20. Структура 11-метилнонакозана подходит для данного соединения: при ее распаде действительно образуются наблюдаемые ионы (рис. 3.25). Данная структура не противоречит биохимическим принципам приращения углеродной цепи насекомых: с обеих сторон от метильного разветвления наблюдается четное число атомов углерода.

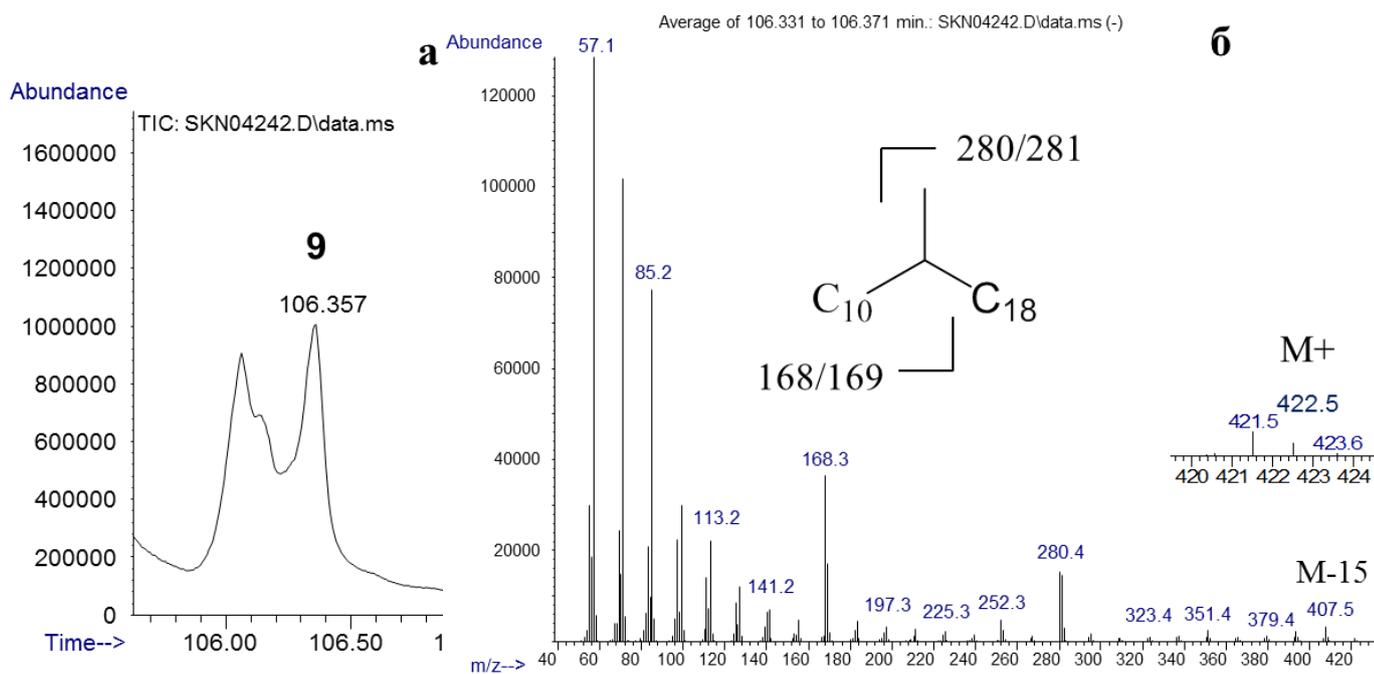


Рис. 3.25. Фрагмент хроматограммы по полному ионному току для пика №9 хроматографического профиля куколок колорадского жука (а) и соответствующий ему масс-спектр 11-метилнонакозана и схема его распада (б)

3.4.2. Анализ сложных пиков из хроматографических профилей эпикутикулярных липидов

Другой пример касается пика №25 из хроматограммы имаго колорадского жука. Так, из хроматограммы по полному ионному току видно, что данный пик двойной (рис.3.26). В данном случае проводили реконструкцию хроматограммы по предполагаемым характеристическим ионам, которые можно выявить при анализе масс-спектров с левого и правого склона пика №25.

При реконструкции хроматограммы по ионам с m/z 168, 196, 252, 267, 323 видно, что для первого соединения характеристические ионы с m/z 168/169, 252/253, 266/267, 350/351, для второго – с m/z 168/169, 196/197, 322/323, 350/351 (рис. 3.26б). Ионы с m/z 168/169 соответствуют фрагменту C12, ионы с m/z 196/197 – фрагменту C14, ионы с m/z 252/253 – фрагменту C18, ионы с m/z 266/267 – фрагменту C19, ионы с m/z 322/323 – фрагменту C23, ионы с m/z 350/351 – фрагменту C25. Рассчитанные ЛИУ составляют 3355 и 3358 для первого и второго соединений соответственно (Приложение 3). В масс-спектрах наблюдаются молекулярные ионы с m/z 492, следовательно брутто-формула данных алканов – $C_{35}H_{72}$. В литературе данным значениям ЛИУ соответствуют внутренне разветвленные диметилалканы с длиной главной цепи C33: 3353 – 13,17-диметилтриакоктан [146], 3356 – 11,21-диметилтриакоктан [8], 3361 – 11,17-диметилтриакоктан [169].

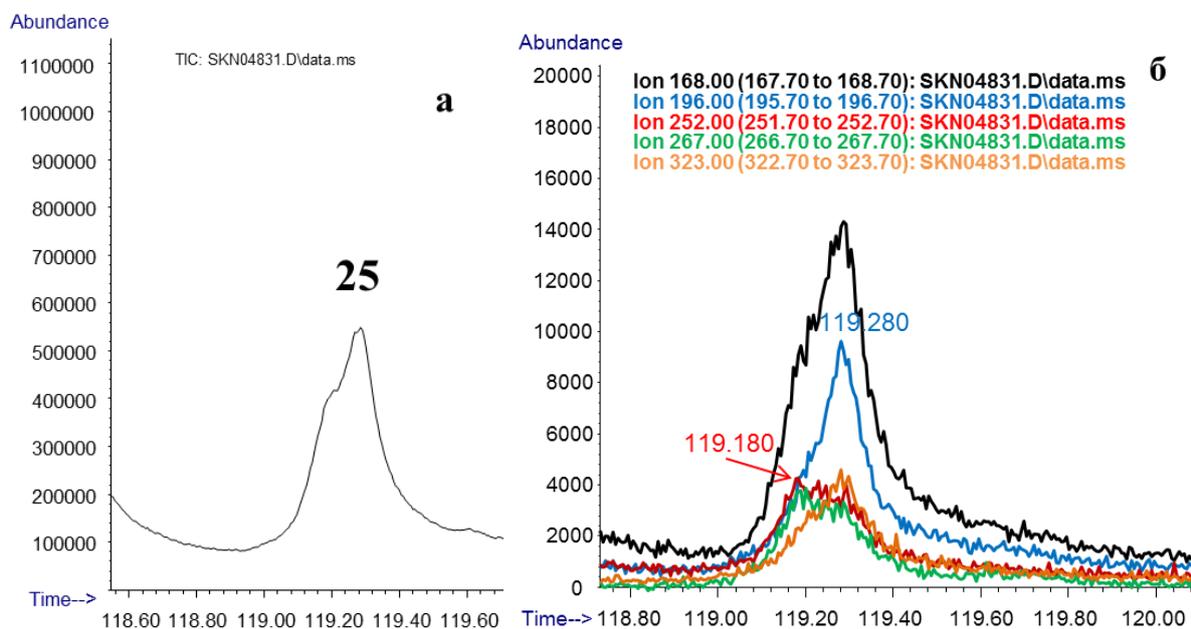


Рис. 3.26. Фрагмент хроматограммы по полному ионному току (а) и фрагмент масс-хроматограммы, полученный реконструкцией по характеристическим ионам с m/z 168, 196, 252, 267 и 323 (б) для пика №25 хроматографического профиля имаго колорадского жука

Исходя из наблюдаемых характеристических ионов для первого соединения подходит структура 11,17-диметилтриакоктана, для второго – 11,21- диметилтриакоктана. Данные структуры не противоречат правилам биохимической осуществимости [6, 173, 174]. Масс-спектры и схемы распада приведены на рис. 3.27, 3.28.

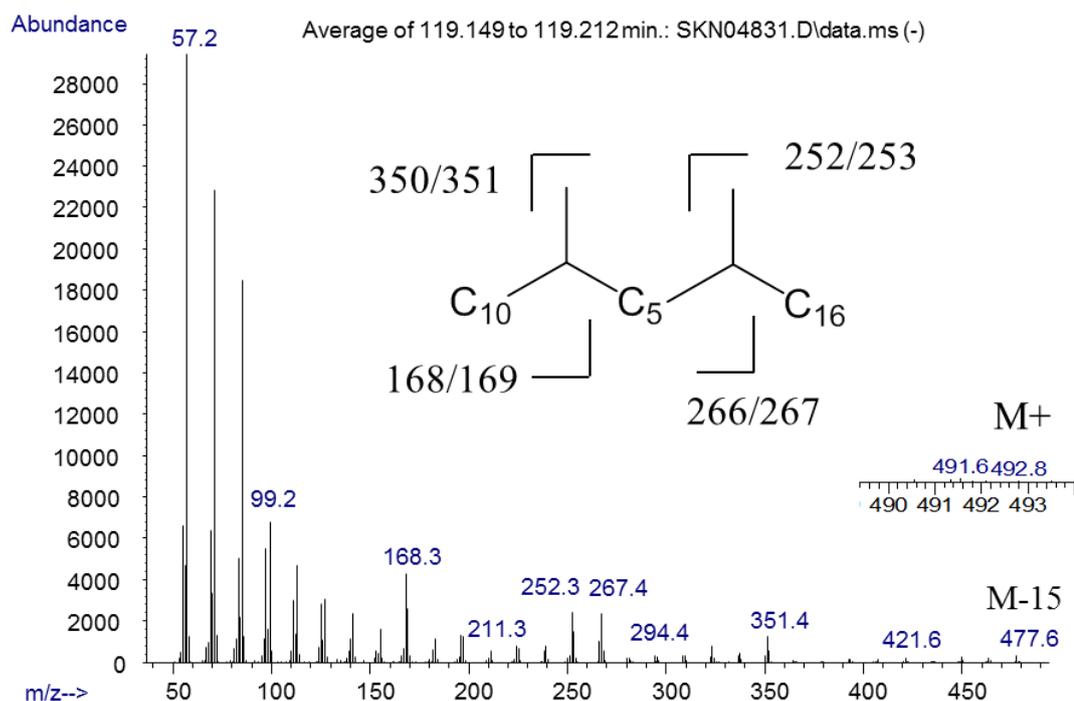


Рис. 3.27. Масс-спектр 11,17-диметилтриакоктана из пика №25 хроматографического профиля имаго колорадского жука и схема его распада

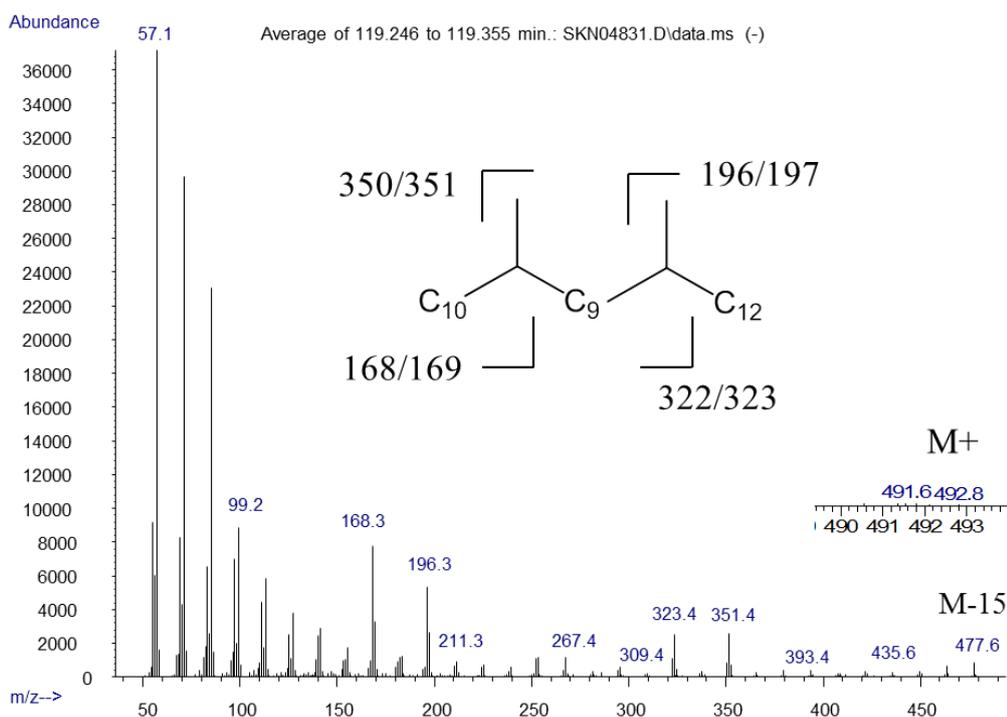


Рис. 3.28. Масс-спектр 11,21-диметилтриакоктана из пика №25 хроматографического профиля имаго колорадского жука и схема его распада

Более сложная задача возникает при установлении химического строения соединений пика №30 из хроматографического профиля эпикутикулы итальянского пруса (рис. 3.20б). Для данного пика масс-спектры с левого и правого склона не совпадали, следовательно данный пик является сложным. При реконструкции хроматограммы по предполагаемым характеристичным ионам с m/z 168, 196, 224, 252 обнаруживается, что данный пик состоит из 4-х соединений (рис. 3.29). Для каждого соединения был рассчитан ЛИУ: 3528 для первого, 3529 для второго, 3530

для третьего, 3532 для четвертого (Приложение 14). В литературе [6, 135, 140, 146, 163-165, 167, 170, 172] рассчитанным значениям ЛИУ соответствуют монометилалканы с длиной главной цепи C35. К тому же в масс-спектрах наблюдается молекулярный ион M⁺ с m/z 506, что подтверждает брутто-формулу данных соединений – C₃₆H₇₄. Для первого соединения характеристические ионы с m/z 252/253 и 280/281, для второго – 224/225 и 308/309, для третьего – 196/197 и 336/337, для четвертого – 168/169 и 364/365. Ионы с m/z 168/169 соответствуют фрагменту C12, ионы с m/z 196/197 соответствуют фрагменту C14, ионы с m/z 224/225 – фрагменту C16, ионы с m/z 252/253 – фрагменту C18, ионы с m/z 280/281 – фрагменту C20, ионы с m/z 308/309 – фрагменту C22, ионы с m/z 336/337 – фрагменту C24, ионы с m/z 364/365 – фрагменту C26.

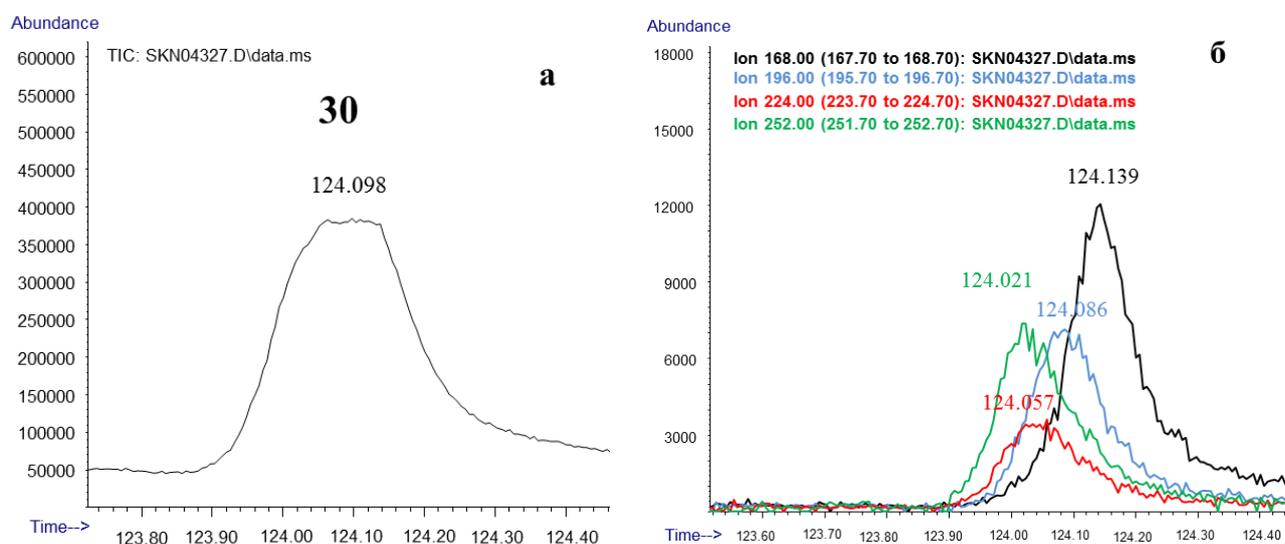


Рис. 3.29. Фрагмент хроматограммы по полному ионному току (а) и фрагмент масс-хроматограммы, полученный реконструкцией по характеристическим ионам с m/z 168, 196, 224, 252 (б) для пика №30 хроматографического профиля итальянского пруса

Исходя из наблюдаемых характеристических ионов для первого соединения подходит структура 17-метилпентатриаконтана (литературные значения ЛИУ: 3520 [172], 3526 [146]), для второго – структура 15-метилпентатриаконтана (литературные значения ЛИУ: 3526 [6] и 3533 [135]), для третьего и четвертого – структуры 13- и 11-метилпентатриаконтанов соответственно (литературные значения ЛИУ: 3533 [167] и 3534 [164]). Данные структуры не противоречат принципам биохимической осуществимости [6]. Масс-спектры и схемы распада идентифицированных соединений приведены на рис. 3.30.

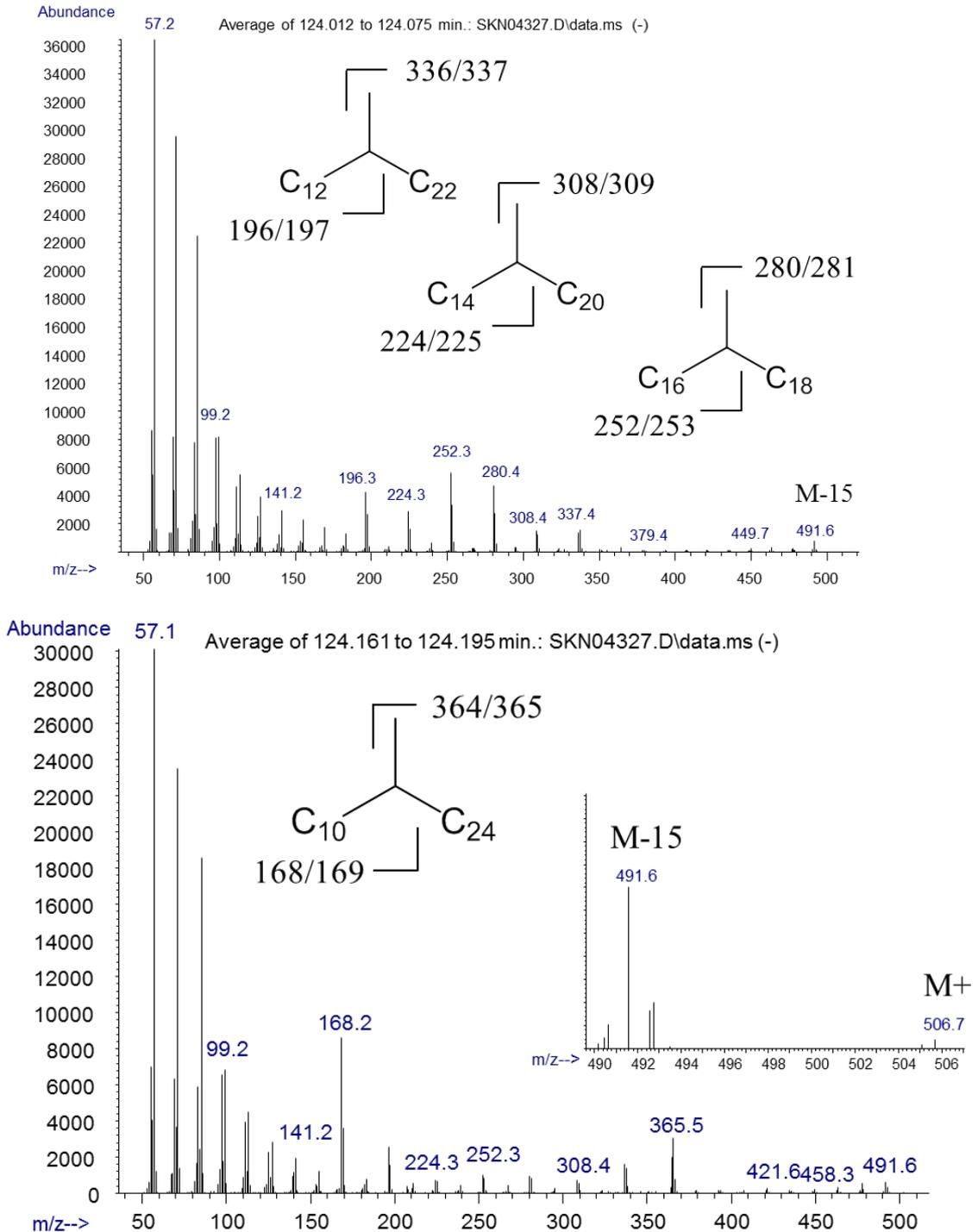


Рис. 3.30. Масс-спектры 17-, 15-, 13- и 11-метилпентатриаконтанов из пика №30 хроматографического профиля итальянского пруса и схемы их распада

В приведенных примерах характеристичные ионы в масс-спектрах наблюдались парами: 168/169, 196/197, 224/225, 252/253 и т.д. И в случае пика №9 из эпикутикулы колорадского жука, и пика №30 из эпикутикулы итальянского пруса интенсивности четных ионов были выше интенсивностей нечетных ионов (рис. 3.25, 3.30). Такая закономерность характерна для монометилалканов [150]. Нечетные ионы происходят при разрыве С-С связи в месте разветвления углеводорода, а четные образуются при дальнейшем отрыве водорода от фрагментарного иона.

3.4.3. Разработка алгоритма по выявлению характеристических ионов в масс-спектрах метилразветвленных алканов для их идентификации в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях эпикутикулярных липидов

При анализе подобных пиков, состоящих из нескольких соединений и сложных для хромато-масс-спектрометрического анализа, часто возникает проблема выявления характеристических ионов в масс-спектрах, образующихся при распаде молекулы в местах разветвления углеродной цепи. С целью надежного выявления характеристических ионов в масс-спектрах, которое позволяет надежно установить химическое строение метилразветвленных углеводородов, был разработан следующий алгоритм по выявлению характеристических ионов.

В качестве основы был выбран масс-спектр линейного алкана C₃₃ (рис. 3.31). В области m/z от 113 до 407, в которую входят характеристические ионы исследуемых соединений, интенсивность ионов нормировалась к самому интенсивному иону в масс-спектре, а затем по ним строилась анаморфоза и рассчитывались параметры линейной регрессии (рис. 3.32). На основании рассчитанной регрессии был построен $\pm 3\sigma$ -интервал по стандартному отклонению аппроксимации. В случае, если интенсивность характеристического иона метилразветвленного алкана превышала верхний предел 3σ -интервала, то ион считался характеристическим для данного соединения, в противном случае – нет.

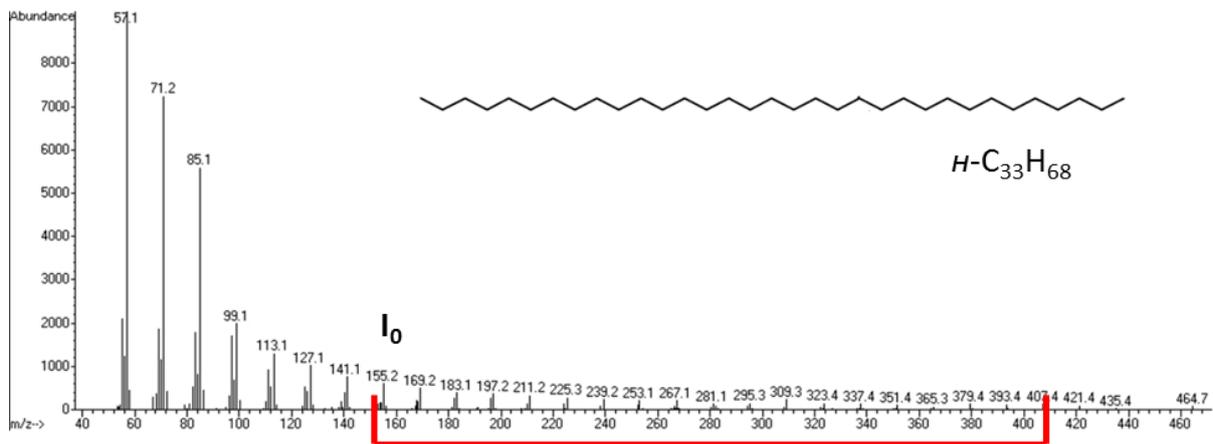


Рис. 3.31. Масс-спектр *n*-тритриаконтана

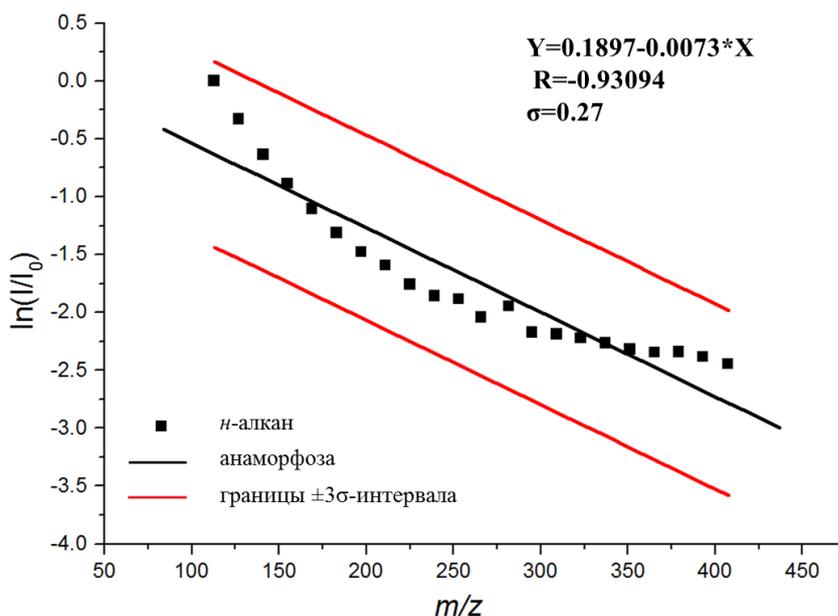


Рис. 3.32. Рассчитанная анаморфоза и $\pm 3\sigma$ -интервал для интенсивностей ионов в масс-спектре *n*-тритриаконтана

В качестве примера показаны результаты применения данного алгоритма для соединений из сложного пика №38 хроматографического профиля итальянского пруса. Согласно масс-хроматограмме, полученной реконструкцией по предполагаемым характеристичным ионам, данный пик состоит из двух соединений. Для первого рассчитанный линейный индекс удерживания – 3757, для второго – 3760 (рис. 3.33). В литературе данным значениям ЛИУ отвечают внутренне разветвленные диметилалканы с длиной главной цепи C37: 3744 – для 13,23-диметилгептатриаконтана [8], 3758 – для 13,17-, 13,19-, 13,21-, 13,23-, 13,25- и 11,23-диметилгептатриаконтанов [6], 3760 – для 13,21- и 13,23-диметилгептатриаконтанов [135]. Наблюдаемые молекулярные ионы с m/z 548 подтверждают брутто-формулу: C₃₉H₈₀. Масс-спектры соединений приведены на рис. 3.34.

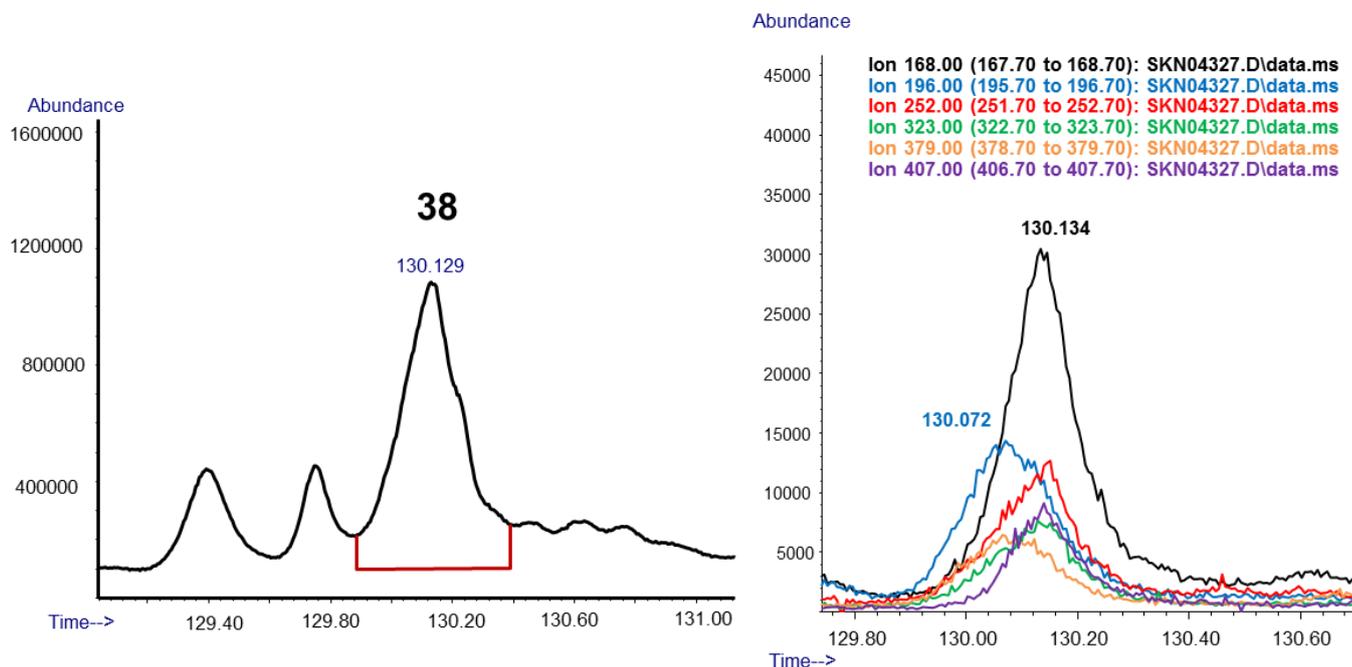


Рис. 3.33. Фрагмент хроматограммы по полному ионному току и фрагмент масс-хроматограммы, полученный реконструкцией по предполагаемым характеристическим ионам с m/z 168, 196, 252, 323, 379 и 407 из пика №38 хроматографического профиля итальянского пруса

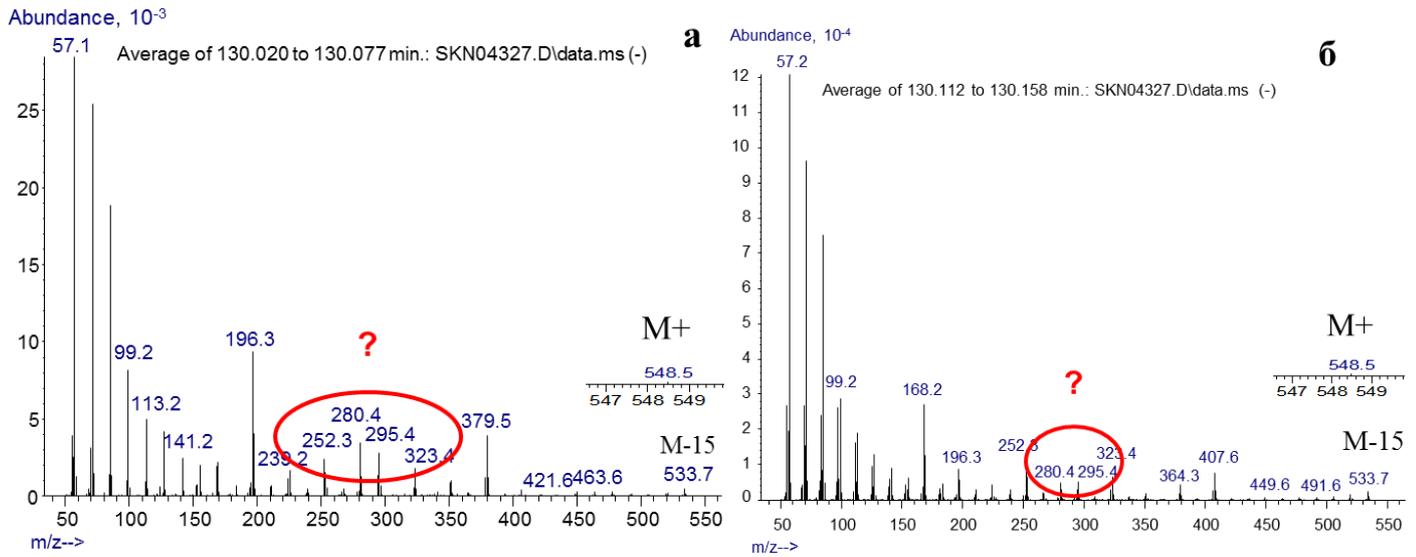


Рис.3.34. Масс-спектры соединений из пика №38 хроматографического профиля итальянского пруса

Применяя данный алгоритм, находим, что для первого соединения с ЛИУ 3757 только интенсивность ионов с m/z 196 и 379 превышает верхний предел 3σ -интервала, а для второго – интенсивность ионов с m/z 168, 252, 323 и 407 (рис. 3.35), и установление структуры проводилось с учетом только этих ионов.

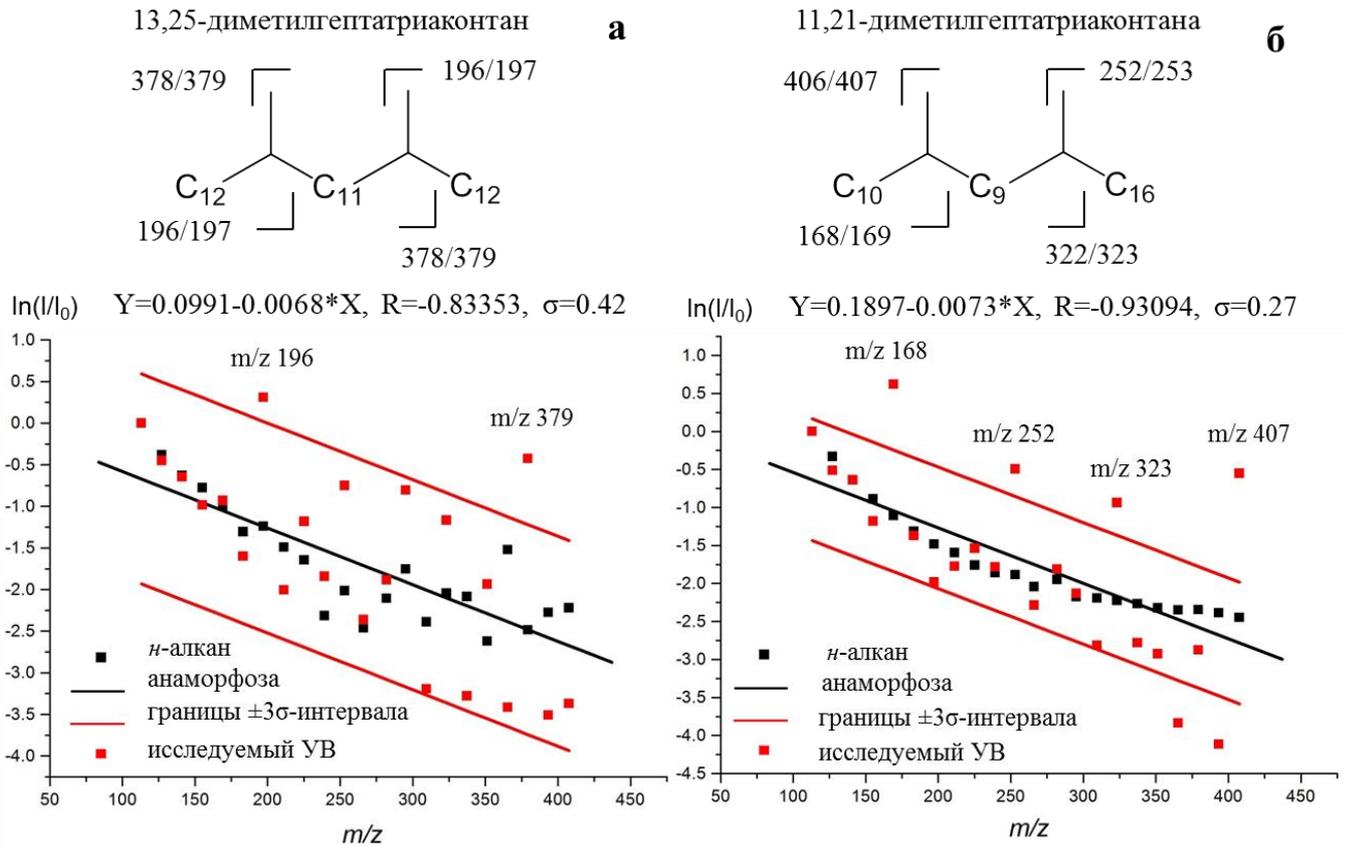


Рис. 3.35. Схема выявления характеристичных ионов для соединений из пика №38 хроматографического профиля итальянского пруса: 13,25-диметилгептатриаконтана (а) и 11,21-диметилгептатриаконтана (б)

Из структур, описанных в литературе, для первого соединения подходит симметричный 13,25-диметилгептатриаконтан, при распаде которого образуются две одинаковые пары ионов с m/z 196/197 и 378/379 (рис. 3.35а). Для второго соединения ни одна из структур, описанных в литературе, не подходила по распаду под выявленные характеристические ионы. Тогда для данного соединения была составлена предположительная структура, дававшая наблюдаемые ионы и непротиворечащая принципам биохимической осуществимости. Ион с m/z 168/169 соответствует разветвленному фрагменту с 12 атомами углерода, следовательно одна метильная группа находится в 11 положении. Наличие четырех разных ионов говорит о том, что углеводород несимметричный. В итоге было установлено, структура 11,21-диметилгептатриаконтана при распаде образует выявленные характеристические ионы (рис. 3.35б). Данное соединение не противоречит правилам биосинтеза метилразветвленных алканов: между метильными группами нечетное число атомов углерода, с обоих концов четное число атомов углерода.

3.4.4. Изомерно-гомологические ряды эпикутикулярных углеводородов имаго колорадского жука

Полученные данные позволили количественно определить основные биохимические направления синтеза метилразветвленных углеводородов имаго колорадского жука и выявить

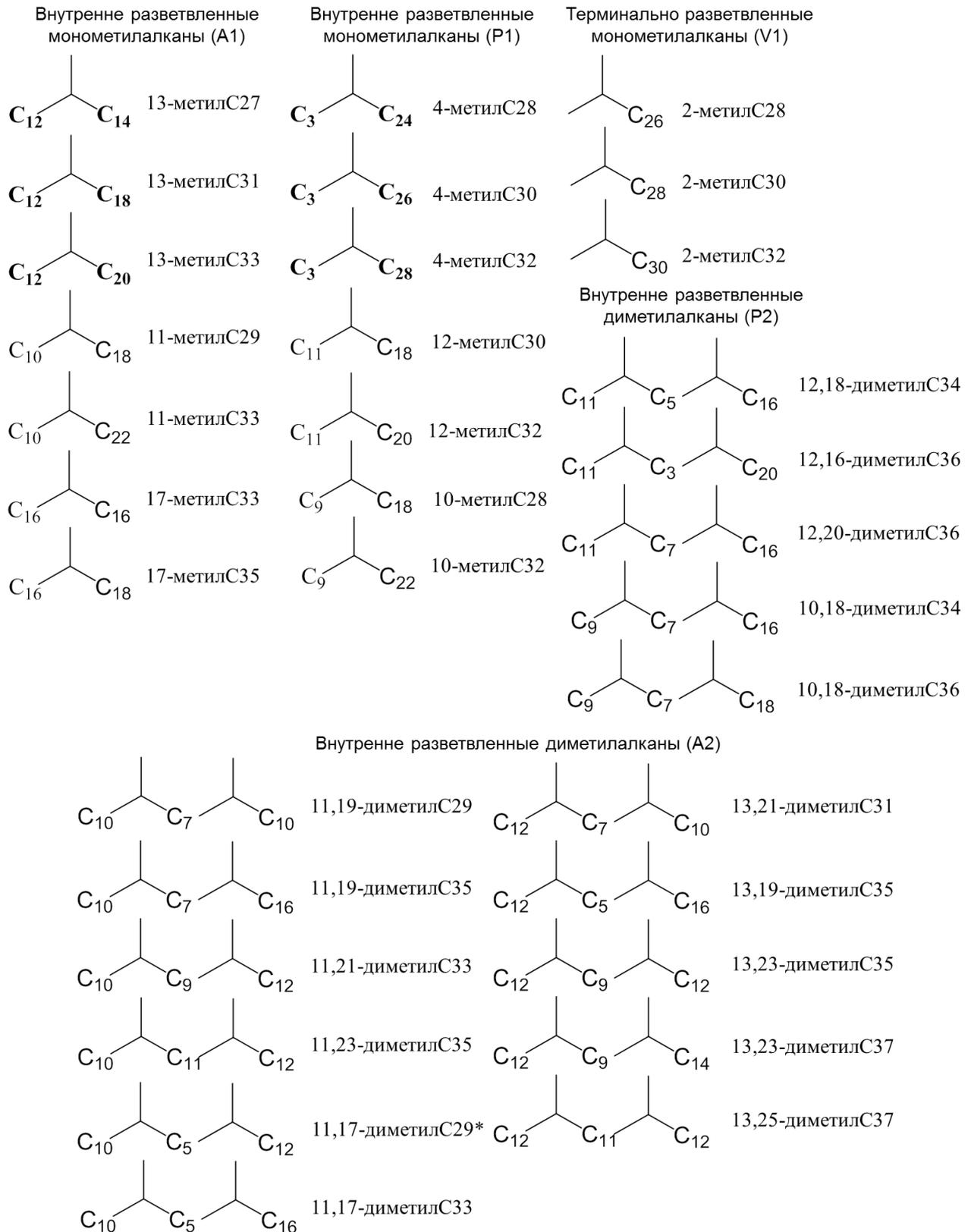
их гомологические ряды. Множество идентифицированных метилразветвленных углеводов имаго представляют собой 8 семейств гомологических рядов, синтезируемых по определенным биохимическим путям [203]. Основной структурной группой на всех стадиях являются терминально разветвленные алканы с замещением во 2 положении, синтезируемые из валина и имеющие нечетное количество атомов углерода между первым и вторым разветвлением. По этому направлению у имаго происходит синтез $50.7 \pm 1.3\%$ кутикулярных углеводов. В данной группе самое высокое содержание наблюдалось для диметилизомеров, основным из которых был 2,6-диметилноктакозан ($13.5 \pm 0.6\%$). Единственный идентифицированный изомер с четным числом атомов углерода между метильными разветвлениями – 2,23-диметилнонакозан, его содержание составило $< 1\%$ (рис. 3.6) [203].

Полученные нами данные по углеводородному профилю эпикутикулы имаго колорадского жука сибирской популяции соответствуют данным, полученным ранее Нельсоном и соавторами на американской популяции колорадского жука из Фарго, Невада [6]: композиция имела сходный диапазон молекулярных масс углеводов с преобладанием терминально разветвленных ди- и триметилалканов.

Для описания изомерно-гомологических рядов идентифицированных углеводов мы использовали следующее обозначение. Буква указывает вещество, с которого начинался синтез цепи (V – валин, A – ацетил-CoA, P – пропионил-CoA), цифра указывает количество метильных групп в структуре. В группе терминально разветвленных моноалканов V1 было идентифицировано три соединения с длиной главной цепи C28, C30 и C32. В группе терминально разветвленных диметилалканов V2 наблюдались 2,X-диметилалканы с длиной цепи C26-C34. В группе терминальных триметилалканов V3 были представлены 2,10,X- и 2,12,Y-триметилизомеры с длиной цепи C28-C34. В ряду внутренне разветвленных моноалканов A1 выявлены 11-, 13- и 17-метилизомеры с длиной цепи C27-C35. В группе внутренне разветвленных диметилалканов A2 наблюдались 11,X- и 13,Y-диметилалканы с длиной цепи C29-C37. В группе A3 было идентифицировано только одно соединение – 13,17,25-триметилгептатриаконтан. В группе P1 выявлены 4-, 10- и 12-метилалканы с длиной цепи C28-C32. В группе P2 наблюдался узкий ряд 10,X- и 12,Y-диметилалканов с длиной цепи C34 и C36. Среди структур, синтезируемых из пропионила-CoA, не было обнаружено триметилалканов.

На рис. 3.36 приведены изомерно-гомологические ряды основных биохимических семейств идентифицированных эпикутикулярных метилразветвленных алканов колорадского жука. Из полученных данных следует, что у терминально разветвленных алканов между первой и второй метильными группами нечетное число атомов углерода, что свидетельствует о начале синтеза с валина. У внутренне разветвленных алканов между метильными группами, а также

между второй и третьей группами у терминально разветвленных алканов всегда нечетное число атомов углерода. У всех групп углеводородов после последнего метильного разветвления четное число атомов углерода. Выявленные изомерно-гомологические ряды подтверждают правила приращения углеродной цепи метилразветвленных алканов. Содержание основных групп метилразветвленных алканов колорадского жука и биохимические пути их синтеза приведены в табл. 3.3.



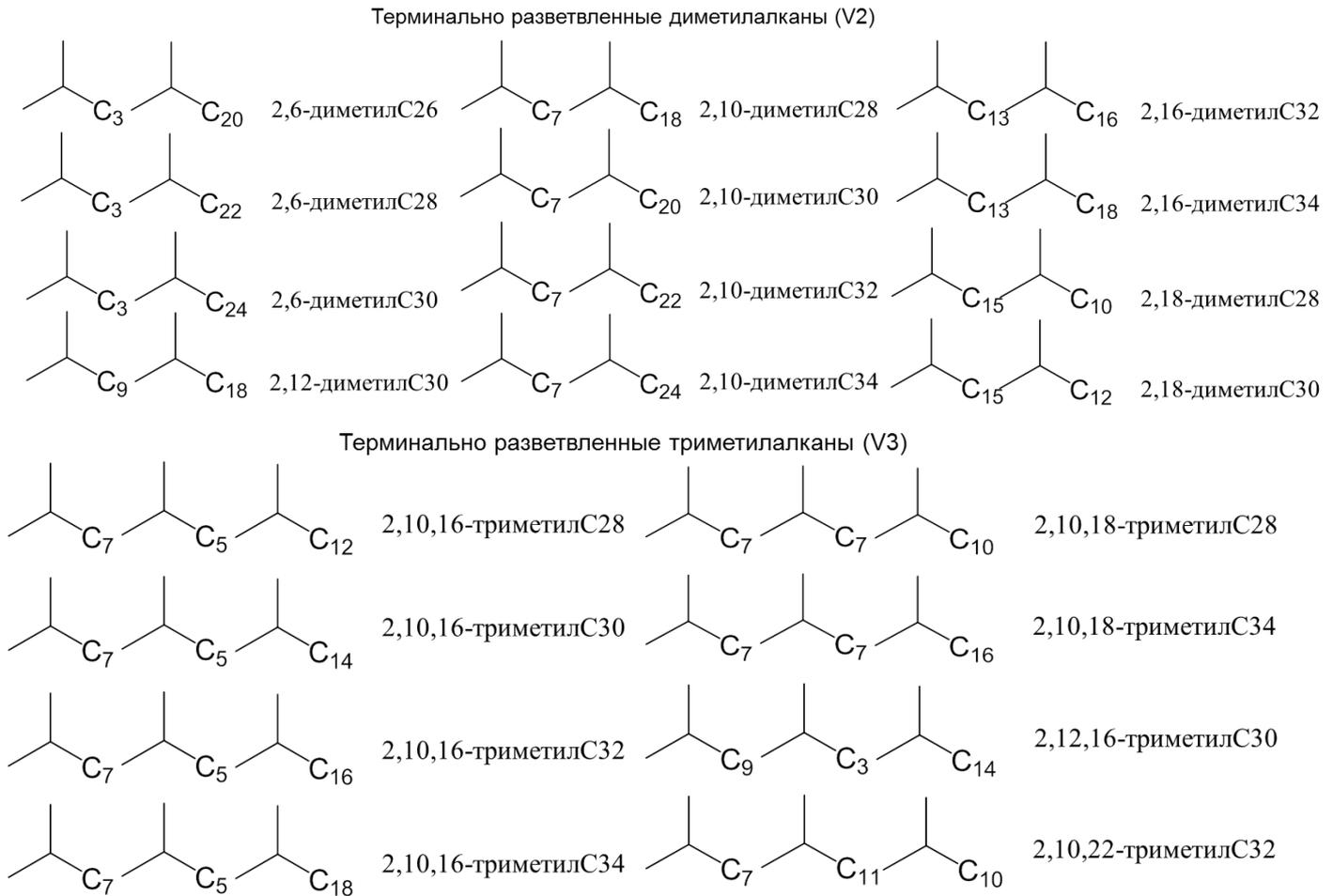


Рис. 3.36. Изомерно-гомологические ряды основных биохимических групп эпикутикулярных углеводов имаго колорадского жука. В названиях структур указано число атомов углерода в главной цепи. * предположительная структура

Таблица 3.3. Количественное содержание идентифицированных углеводов из эпикутикулы имаго колорадского жука (% от эпикутикулярных липидов, N=5)

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

Строение выявленных изомерно-гомологических рядов показывает, что приращение углеводородных цепей через вставку двууглеродного фрагмента может происходить как в концевой части цепи (ряд 2,10-диметилалканов), так и между метильными группами (11,21-диметилтриакоктан и 11,23-диметилпентатриакоктан). Среди рядов терминально разветвленных ди- и триметилалканов самыми часто встречающимися положениями

разветвления в середине цепи были 6, 10, 16, 18. Интересно также отметить, что в рядах терминально разветвленных алканов между метильными группами встречаются не все возможные фрагменты с нечетным количеством атомов углерода: так, в группе терминально разветвленных диметилалканов не встречаются фрагменты с 5 и 11 атомами углерода. А между первой и второй метильными группами триметилалканов встречаются только фрагменты с 7 и 9 атомами углерода. По-видимому, вставка метильной группы в цепи происходит в строго определенных местах, и существуют биохимические механизмы, которые это контролируют. Среди рядов внутренне разветвленных моно- и диметилалканов, синтез которых начинался с ацетила-СоА, чаще всего встречались разветвления в положении 11 и 13, по всей вероятности это еще одна особенность процессов биосинтеза углеводов у колорадского жука. В случае метилразветвленных алканов, синтезируемых из ацетила-СоА, невозможно определить биохимические «начало» и «конец» цепи: с обеих сторон до метильной группы четное число атомов углерода. В случае же исходного соединения пропионила-СоА биохимическое «начало» находится со стороны нечетно-углеродного фрагмента, а «конец» – со стороны четно-углеродного фрагмента.

Следует отметить, что в американской популяции колорадского жука встречались изомеры с другим распределением метиленовых единиц между метильными группами [6]. Так, в ряду терминальных диметилалканов были структуры с 5 и 11 атомами углерода между метильными группами (2,8-диметилгексакозан и 2,14-диметилдотриаконтан), а также структуры с 1 метиленовой единицей между точками разветвления (2,4-диметилоттакозан и 2,4-диметилтриаконтан) и 17 метиленовыми единицами (2,20-диметилгексатриаконтан). В ряду терминальных триметилалканов присутствовали изомеры с тремя атомами углерода между первой и второй точками разветвления (2,6,12-триметилтриаконтан), а также изомеры с третьей метильной группой в положении 20: 2,12,20- и 2,10,20-триметилтриаконтаны, которые отсутствовали в сибирской популяции. Помимо этого в американской популяции присутствовали терминальный тетраметилалкан – 2,10,14,18-тетраметилтетрааконтан, а также терминально разветвленные алканы с нечетно-углеродной главной цепью и четным числом атомов углерода между первой и второй метильными группами: 2,17-, 2,19-, 2,21-, 2,23-, 2,25-диметилалканы и 2,17,Х-триметилалканы. Последние по мнению авторов синтезируются из лейцина.

Для группы внутренне разветвленных алканов также были отличия. В целом, в американской популяции диапазон молекулярных масс был шире: С27-С39 для группы А2 и С28-С38 для группы Р2. В группе А2 наблюдались изомеры с метильными группами в положениях 7 и 9, отсутствующие в сибирской популяции; а в группе Р2 были структуры с 11 атомами углерода между точками разветвления (12,24-диметилоттатриаконтан). В

американской популяции в группе внутренне разветвленных триметилалканов, синтезируемых из ацетила-СоА (А3), было обнаружено 11 изомеров с длиной цепи С33-С55, в то время как в сибирской популяции только один изомер. К тому же в американской популяции выявлен один тетраметилизомер: 13,17,21,25-тетраметилгептатриаконтан, нечетная главная цепи указывает на ацетил-СоА как исходное вещество. В обеих популяциях отсутствовали триметилалканы, синтезируемые из пропионил-СоА. Подобные отличия возможно связаны с различиями в условиях обитания жука.

Авторы работ [6,7] считают, что преобладание широкого ряда метилразветвленных углеводов с замещением во 2-м положении – уникальная особенность колорадского жука. Действительно, у других представителей отряда Coleoptera наблюдаются другие профили кутикулярных углеводов. Так, у личинок жука *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera, Bostrichidae) доминируют линейные алканы – С27, С29, С31, а также присутствуют моно- и диметилалканы с нечетной главной цепью и нечетными положениями метильных групп: 3-, 11-, 13-, 15- у моноалканов и 11,15- у диметилалканов [204]. У жука *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) также преобладали линейные алканы – С23, С25, С29 и наблюдались метилразветвленные углеводороды с нечетной главной цепью [205]. Похожая тенденция наблюдалась и для родственных видов из семейства Chrysomelidae [206]. В кутикуле взрослых особей жуков *Diabrotica longicornis* и *D. barberi* обнаружены *n*-алканы, моно- и диметилразветвленные алканы, *n*-алкены и монометилразветвленные алкены. У *D. longicornis* главными соединениями кутикулы были *n*-С27, 13-, 11-, 9-, 7- и 3-метилгептакозаны, 11,15-, 9,13- и 7,11-диметилгептакозаны; у *D. barberi* – те же соединения, а также 13-, 11-, 7- и 3-метилнонакозаны, 11,15-, 9,13- и 7,11-диметилнонакозаны, 9-метилС30:1, X-метил-1-триаконтан. У некоторых представителей семейства Chrysomelidae в эпикуткуле представлены терминально разветвленные углеводороды, но не в таком структурном разнообразии, как у колорадского жука. В эпикуткуле подсолнечникового листоеда *Zygogramma exclamationis* (Coleoptera: Chrysomelidae) обнаружены терминально разветвленные моноалканы: 2-метилС24, 2-метилС25, 2-метилС26, 2-метилС28, 2-метилС32 [60]. Эти соединения были не основными, но у самок их содержание было в 2 раза ниже по сравнению с самцами и личинками. У самок и самцов главными углеводородными компонентами были внутренне разветвленные ди- и триметилалканы (11,15- и 9,15- диметилгептакозаны и 13,17,21-триметилнонатриаконтан), в то время как у личинок преобладали *n*-алканы (*n*-гептакозан и *n*-нонакозан) и диметилалканы. У блошиных жуков в кутикуле обнаружены алканы в замещением во 2-м положении [149]. У *Aphthona lacertosa* главным компонентом был 2-метилоктакозан, а у *Aphthona nigricutis* – 2-метилтриаконтан. Среди диметилалканов были представлены 2,6- и 2,4-диметилоктакозан; 2,12-, 2,10- и 2,6-диметилтриаконтан; 2,12-, 2,10- и 2,6-диметилдотриаконтан. В кутикуле данных

видов к тому же присутствовали в небольших количествах триметилалканы: 2,10,12-триметилдотриаконтан и 2,10,12-триметилтетратриаконтан, а также тетраметилизомер: 2,10,12,24-тетраметилтетратриаконтан. Помимо этого обнаружены структуры с нечетно-углеродной главной цепью и четным количеством атомов углерода между первой и второй метильными группами: 2,23-диметилнонакозан, 2,25-диметилгентриаконтан и 2,7,11-триметилгентриаконтан. Все они были в следовых количествах и синтезировались из лейцина.

Следует отметить, что у некоторых насекомых других отрядов обнаружены терминально разветвленные углеводороды. Так, во внутренних липидах куколки кукурузной совки *Helicoverpa zea* (Lepidoptera, Noctuidae) были обнаружены в следовых количествах изомеры терминально разветвленных алканов: 2,18,20-триметилтетратриаконтан, 2,18,20-триметилгексатриаконтан и 2,24,26-триметилдотетрааконтан [207]. Между первой и второй метильными группами нечетное количество атомов углерода, что свидетельствует о начале синтеза с валина. Помимо этого, показано, что 2,5-диметилгептадекан является одним из компонентов в смеси контактных половых феромонов самок пяденицы *Lambdina fiscellaria* (Lepidoptera, Geometridae) [156]. Нечетно-углеродная главная цепь, а также четное число атомов углерода между метильными группами указывает, по-видимому, на лейцин как исходное соединение.

Характерной особенностью углеводородной композиции эпикутикулы колорадского жука является отсутствие нормальных и ненасыщенных компонентов. Существует мнение, что преимущественно *n*-алканы задействованы в защите от обезвоживания благодаря высокой температуре плавления [8,35]. Но в то же время высказывается мнение, что метилразветвленные алканы и моноалкены с одной стороны обладают промежуточной температурой плавления, с другой стороны создают структурно разнообразные композиции, обладающие большой информационной емкостью [52]. И таким образом данные соединения могут участвовать как в предотвращении обезвоживания, так и в химических коммуникациях, т.е. обладать двойными признаками. Можно предположить, что и в случае колорадского жука сложная суперпозиция метилразветвленных углеводородов включает в себе эти две функции. Такой баланс свойств эпикутикулы, по-видимому, закодирован в биохимических путях, по которым синтезируются метилразветвленные алканы. Помимо этого, большое разнообразие метилразветвленных изомеров расширяет диапазон плавления кутикулярных углеводородов и увеличивает текучесть, что обеспечивает стабильность углеводородной матрицы, равномерное обволакивание поверхности насекомого, растворение полярных компонентов и углеводородных химических сигнальных веществ [8,35].

Выявленные изомерно-гомологические ряды можно использовать в качестве принципа структурной гомологии при идентификации метилразветвленных углеводов из сложных смесей эпикутикулярных липидов насекомых.

3.5. Оценка метрологических характеристик количественного определения эпикутикулярных углеводов

Для достоверного количественного определения содержания углеводов в эпикутикуле насекомых необходимо определить метрологические характеристики метода измерения. Были оценены метрологические характеристики количественного определения метилразветвленных углеводов в экстрактах эпикутикулярного слоя насекомых методом ГХ/МС: линейный динамический диапазон измеряемых концентраций, предел обнаружения, прецизионность (показатель повторяемости и показатель внутрिलाбораторной прецизионности) и погрешность.

Показатель повторяемости рассчитан для 12 параллельных измерений концентрации основных соединений экстракта эпикутикулы итальянского пруса в концентрации 0.5 мг/мл (рис. 3.37).

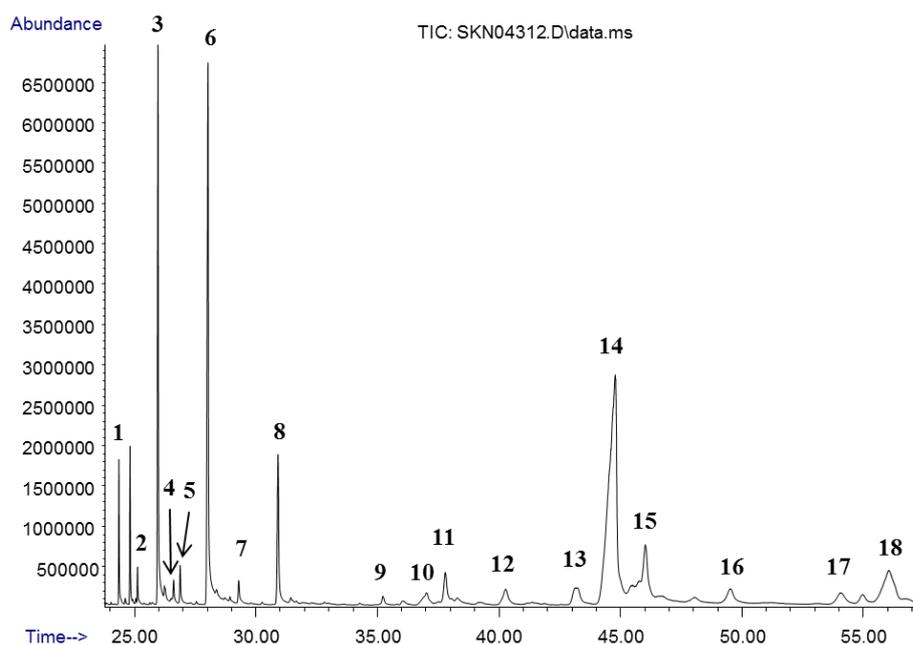


Рис. 3.37. Хроматограмма образца эпикутикулы итальянского пруса для определения показателя повторяемости. Номера пиков соответствуют таблице в Приложении 22

По результатам измерений для каждого пика было рассчитано среднее квадратичное отклонение (СКО), которое и принималось за показатель повторяемости [208-210]. Результаты приведены в таблице в Приложении 22.

Данные по повторяемости позволяют оценить погрешность Δ количественного определения предельных углеводов в эпикутикуле насекомых согласно [210]:

$$\Delta = 1.96\sigma,$$

где σ – показатель повторяемости, за который принимается значение СКО

Предварительно данные были проверены на нормальное распределение по критерию Шапиро-Уилка (Приложение 22). В дальнейший расчет принимались значения только тех пиков, для которых была принята гипотеза о нормальном распределении ($p > 0.05$) (табл. 3.4). Полученные данные позволили выделить два интервала концентраций анализируемых компонентов: 0.001-0.01 мг/мл и 0.01-0.1 мг/мл. Рассчитанные значения повторяемости и погрешностей приведены в табл. 3.4.

Таблица 3.4. Значения показателей повторяемости и погрешности для образца эпикутикулы итальянского пруса. Номера пиков соответствуют таблице в Приложении 22

Диапазон концентраций, мг/мл	№ пика	Значение концентрации, мг/мл	Значение СКО, %	Среднее значение СКО, %	Значение погрешности Δ , %
0.001-0.01	Пик №1	0.00550	1.1	3.8	7.4
	Пик №4	0.00235	12.3		
	Пик №6	0.00500	2.3		
	Пик № 13	0.00685	3.1		
	Пик №16	0.00570	1.3		
	Пик №17	0.00516	2.6		
0.01-0.1	Пик №3	0.0297	1.4	1.7	3.4
	Пик №6	0.0419	1.3		
	Пик №14	0.0978	1.0		
	Пик №15	0.0156	3.0		
	Пик №18	0.0171	2.0		

Таким образом, значение погрешности количественного определения содержания углеводов в экстракте эпикутикулярного слоя итальянского пруса для концентраций 0.001-0.01 мг/мл составило 7.4%, для диапазона концентраций 0.01-0.1 мг/мл – 3.4%.

Оценку показателей внутрилабораторной прецизионности проводили с использованием раствора экстракта эпикутикулярного слоя личинок колорадского жука в концентрации 0.1 мг/мл. Один и тот же образец анализировали на одном и том же оборудовании с разницей в 4 года. В одном эксперименте было 12, в другом – 10 параллельных определений. Предварительно для полученных выборок проверяли гипотезы об однородности стандартных отклонений по критерию Фишера [211, 212]. Для каждой выборки рассчитывалась величина $F_{кр}$ по формуле (6).

$$F_{кр} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \text{ при условии } S_1 > S_2, \quad (6)$$

где $S_i^2 = \frac{1}{v_i} \sum_{j=1}^{n_i} (x_j - \bar{x})^2$ стандартное отклонение для выборки i , $v_i = n_i - 1$ – количество степеней свободы

По результатам изменений не все пики удовлетворяли критерию Фишера. Так, для пиков № 1, 13, 14 рассчитанное значение $F_{кр}$ было больше $F_{табл.}$ Для остальных пиков рассчитывались величины X_m и $S_{Rл}$ по формулам (7) и (8) соответственно [209].

$$X_m = \frac{\sum \bar{X}_i}{L} \quad (7),$$

где \bar{X}_i – среднее арифметическое значение площади внутри одной выборки

$$S_{RЛ} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^L (\bar{X}_i - X_m)^2}{L-1}} \quad (8).$$

Величину $S_{RЛ}$ принимали за показатель внутрилабораторной прецизионности. Результаты приведены в таблице в Приложении 23.

Полученные данные по внутрилабораторной прецизионности позволили выделить два интервала концентраций определяемых компонентов: от 0.0001 до 0.005 мг/мл и от 0.005 до 0.05 мг/мл. Рассчитанные средние значения показателей прецизионности приведены в табл. 3.5.

Таблица 3.5. Значения показателей внутрилабораторной прецизионности для образца эпикутикулы личинок колорадского жука. Номера пиков соответствуют таблице в Приложении 23

Диапазон концентраций, мг/мл	№ пика	Среднее значение концентрации X_m , мг/мл	Значение $S_{RЛ}$, %	Среднее значение $S_{RЛ}$, %
0.0001-0.005	Пик №8,9	0.00358	14.6	22.9
	Пик №10	0.000764	21.9	
	Пик №11	0.00119	24.4	
	Пик №12	0.00155	30.8	
0.005-0.05	Пик №2	0.00720	15.5	16.1
	Пик №3	0.0133	24.5	
	Пик №4	0.0204	10.5	
	Пик №5,6	0.00564	16.5	
	Пик №7	0.00924	13.8	

Как видно из приведенных результатов, для диапазона концентраций 0.0001-0.005 мг/мл среднее значение внутрилабораторной прецизионности составило 22.9%, для диапазона концентраций 0.005-0.05 мг/мл – 16.1%.

Предел обнаружения предельных углеводов в экстракте эпикутикулярного слоя насекомых методом ГХ/МС определен по стандартным растворам *n*-октакозана в гексане. Были приготовлены растворы с концентрацией 0.00075, 0.0005, 0.00025, 0.0001 мг/мл и проанализированы методом ГХ/МС (рис. 3.38). Предел обнаружения предельных углеводов в экстракте эпикутикулы методом ГХ/МС при соотношении сигнал:шум 3:1 составил 0.0001 мг/мл [162, 213, 214]. Содержание всех определяемых углеводов из эпикутикулы исследуемых насекомых было выше данного предела.

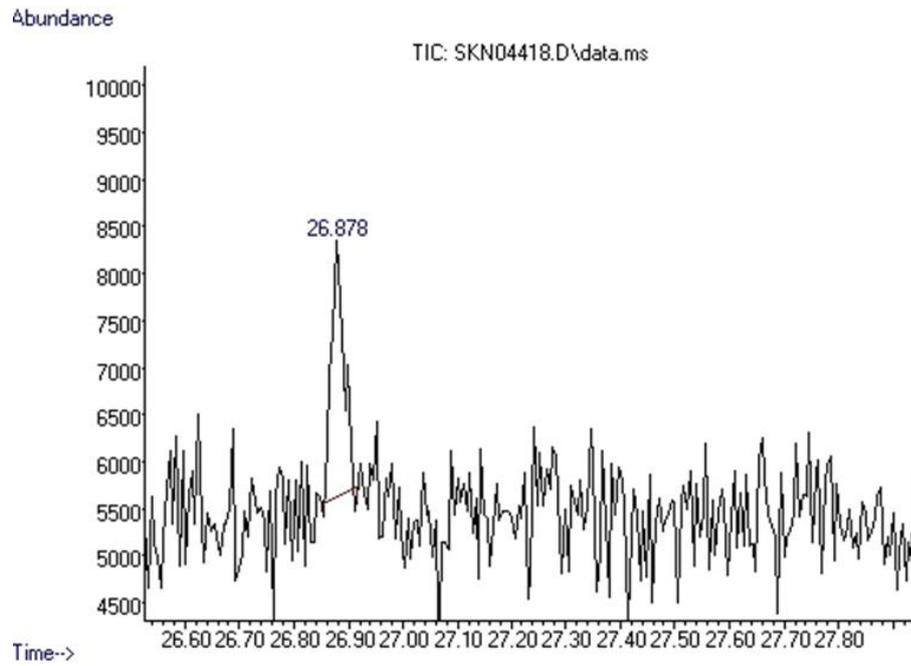


Рис. 3.38. Фрагмент хроматограммы стандартного раствора *n*-октакозана с концентрацией 0.0001 мг/мл

Линейный динамический диапазон определяли при помощи стандартных растворов *n*-октакозана. Линейный динамический диапазон измеряемых концентраций составил 2 порядка от 0.001 до 0.15 мг/мл (рис. 3.39). Рассчитанные содержания углеводов из эпикутикулы насекомых соответствуют данному диапазону.

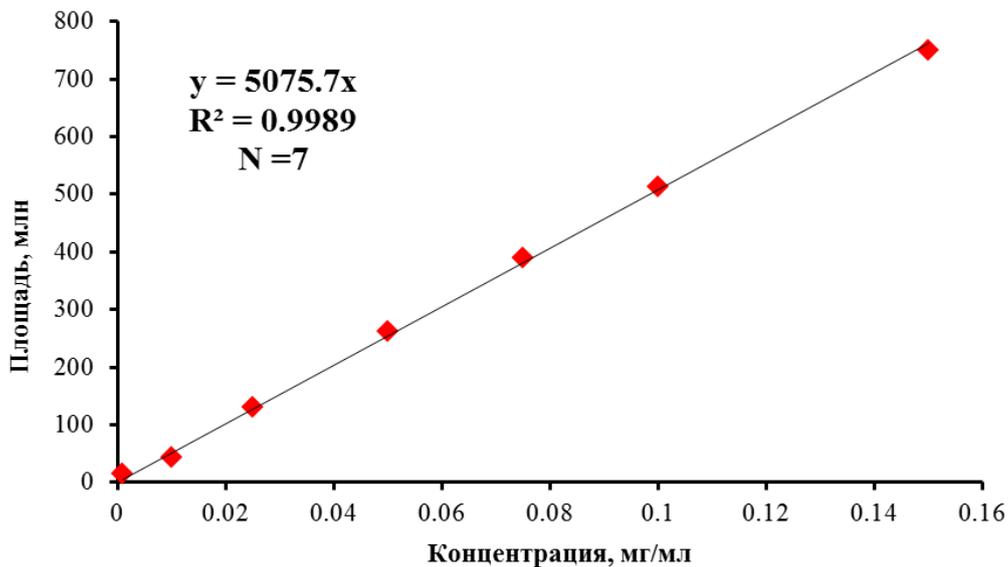


Рис. 3.39. Линейный динамический диапазон

Таким образом, на основании анализа экстрактов эпикутикулярного слоя колорадского жука, итальянского пруса и стандартных растворов были оценены метрологические характеристики количественного определения предельных углеводов в эпикутикуле: показатели прецизионности в условиях повторяемости и внутрिलाбораторной прецизионности,

предел обнаружения, линейный динамический диапазон и погрешность. Полученные характеристики позволяют достоверно определять содержание углеводов в эпикутикуле насекомых.

Заключение

Колорадский жук и стадные саранчовые являются опасными сельскохозяйственными вредителями, наносящими большой урон агрохозяйствам. В настоящее время использование энтомопатогенных грибов – естественных врагов насекомых – является перспективным и экологически безопасным способом регуляции численности вредителей. Патогены проникают в организм насекомого через кутикулу – первый защитный барьер на пути действия факторов опасности: обезвоживания, различных механических и микробных повреждений. Основными компонентами эпикутикулы исследуемых видов являются углеводороды и жирные кислоты.

На сегодняшний день известно, что кутикулярные липиды влияют на восприимчивость насекомых-хозяев к грибным инфекциям, а также могут оказывать воздействие на дифференциацию инфекционных структур и вирулентность патогенов [84], однако нет целостного понимания роли компонентов кутикулы в развитии грибных инфекций. Известно, что грибы могут расти на средах с синтетическими углеводородами *in vitro* [89, 90], описаны биохимические пути деградации углеводов грибами [4,5], но трансформации кутикулярных композиций при микозах в моделях *in vivo* изучены слабо. С экологической точки зрения липидный состав кутикулы связан в первую очередь с адаптациями насекомых к определенным жизненным средам и биоценозам [16, 34, 45], но компромиссы между приспособлениями насекомых к определенным гигротермическим условиям и восприимчивостью к грибным патогенам не до конца ясны. Изучение данных процессов важно для понимания фундаментальных принципов развития грибных патогенов у насекомых, а также для усовершенствования способов управления численностью вредителей.

В рамках работы нами впервые установлены состав и химическое строение углеводов и жирных кислот эпикутикулы личинок и куколок колорадского жука, а также нимф итальянского пруса. Полученные результаты раскрывают ряд аспектов в значении кутикулярных углеводов в развитии грибных патогенов у насекомых. В частности, наши данные показывают на примере личинок колорадского жука, что метилразветвленные алканы стимулируют адгезию конидий гриба *Metarhizium robertsii* к кутикуле. Впервые установлено, что в процессе колонизации гриб метаболизирует метилразветвленные углеводороды личинок колорадского жука, а питание ими усиливает вирулентность патогена.

Кроме того, полученные данные расширяют представление о компромиссе между защитой насекомых от обезвоживания и устойчивостью к грибным инфекциям. В частности, проведенный сравнительный анализ кутикулярных липидов колорадского жука на разных

этапах развития позволил обосновать гипотезу о том, что уменьшение содержания углеводов в эпикутикуле личинок в период завершения питания связано со сменой наземно-воздушной и почвенной сред и соответствующих рисков. В воздушной среде главным фактором опасности для личинок является обезвоживание, и большое количество углеводов необходимо для его предотвращения. При переходе в почву – естественную нишу для патогенных грибов – насекомые менее подвержены риску обезвоживания, но должны выработать надежные механизмы защиты от патогенов. Выявленное уменьшение содержание углеводов при переходе к почвенной стадии развития снижает аттрактивность кутикулы для грибов, что показано нами в эксперименте с адгезией конидий к покровам насекомого.

Увеличение содержания длинноцепочечных углеводов и изменение жирнокислотного состава эпикутикулы колорадского жука в процессе смены фаз 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 и в различную восприимчивость разных фаз развития жука к патогенным грибам.

В рамках диссертационной работы нами были проанализированы различия эпикутикулярного состава саранчовых с разными гигротермическими предпочтениями. Сдвиг углеводородного профиля у итальянского пруса *Calliptamus italicus* в более длинноцепочечную и разветвленную область по сравнению с *Locusta migratoria*, по всей видимости, служит адаптацией к ариднему климату. В то же время это делает кутикулу итальянского пруса более аттрактивной для конидий грибов и повышает его восприимчивость к патогенам по сравнению с более мезофильным видом *L. migratoria*.

Метод ГХ/МС является наиболее эффективным для решения задач установления состава, химического строения и количественного определения метилразветвленных углеводов насекомых. Для установления химического строения метилразветвленных углеводов мы использовали схему, предложенную ранее [6]. Она включала анализ экспериментальных и литературных индексов удерживания, характеристических ионов в масс-спектрах, образующихся при распаде молекулы в местах разветвления, и проверку структуры на биохимическую осуществимость. Для решения проблемы надежного выявления характеристических ионов в масс-спектрах метилразветвленных алканов в многокомпонентных смесях природных липидов нами впервые был разработан алгоритм по их выявлению на основе статистической обработки интенсивностей ионов в масс-спектрах линейных и метилразветвленных алканов. Были оценены метрологические характеристики (показатели прецизионности, погрешность, предел обнаружения, линейный динамический диапазон), которые позволяют надежно определять количественное содержание углеводов в эпикутикуле насекомых.

Показано, что все множество кутикулярных углеводов имаго колорадского жука составляет 8 изомерно-гомологических рядов углеводов, синтезируемых по определенным биохимическим направлениям, основное из которых – синтез терминально разветвленных диметилалканов из валина. Выявленные изомерно-гомологические ряды можно использовать в качестве принципа структурной гомологии при идентификации изомеров метилразветвленных углеводов из эпикутикулы насекомых.

Полученные нами данные являются подтверждением того, что углеводы играют важную роль в развитии грибных инфекций у таких насекомых как колорадский жук и саранчовые, и химический состав эпикутикулы насекомых отражает компромисс функций эпикутикулы и сменой главных факторов опасности на конкретной стадии развития или в определенном местообитании.

С прикладной точки зрения 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 этого вида. Обнаруженное нами усиление вирулентности энтомопатогенных грибов при культивировании на средах с добавлением кутикулярных липидов может позволить усовершенствовать технологию производства конидиальной массы биопрепаратов для усиления их биологической эффективности.

Разработанный алгоритм по выявлению характеристических ионов может быть использован для надежной идентификации веществ в сложных хроматографически трудно разделяемых смесях изомерных и близких по строению органических соединений различных классов природного, антропогенного и синтетического происхождения. Полученные метрологические характеристики позволяют достоверно определять содержание углеводов в эпикутикулярных липидах насекомых.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blomquist G. J., Bagnères A.-G. *Insect Hydrocarbons Biology Biochemistry and Chemical Ecology*. – New York.: Cambridge University Press, 2010. – 506 p.
2. Blomquist G. J., Ginzl M. D. Chemical ecology, biochemistry, and molecular biology of insect hydrocarbons // *Annual review of entomology*. – 2021. – V. 66. – P. 45-60. – <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031620-071754>
3. Islam W., Adnan M., Shabbir A., Naveed H., Abubakar Y. S., Qasim M., Tayyab M., Noman A., Nisar M. S., Khan K. A., Ali H. Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests // *Microbial Pathogenesis*. – 2021. – V. 159. – P. 105122. – <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105122>
4. Pedrini N., Ortiz Urquiza A., Huarte Bonnet C., Zhang S., Keyhani N. O. Targeting of insect epicuticular lipids by entomopathogenic fungi: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – P. 1-18. – <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00024>
5. Pedrini N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies // *Fungal Biology*. – 2018. – V. 122. – No. 6. – P. 538-545. – <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.10.003>
6. Nelson D. R., Adams T. S., Fatland C. L. Hydrocarbons in the surface wax of eggs and adults of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2003. – V. 134. – No. 3. – P. 447-466. – [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00262-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00262-2)
7. Yocum G. D., Buckner J. S., Fatland C. L. A comparison of internal and external lipids of nondiapausing and diapause initiation phase adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* // *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. – 2011. – V. 159. – No. 3. – P. 163-170. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.03.007>
8. Lockey K. H., Oraha V. S. Cuticular lipids of adult *Locusta migratoria migratorioides* (R and F), *Schistocerca gregaria* (Forskål)(Acrididae) and other orthopteran species—II. Hydrocarbons // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1990. – V. 95. – No. 4. – P. 721-744. – [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(90\)90310-P](https://doi.org/10.1016/0305-0491(90)90310-P)
9. Keyhani N. O. Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi // *Fungal biology*. – 2018. – V. 122. – No. 6. – P. 420-429. – <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.07.003>
10. Ortiz-Urquiza A., Keyhani N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle // *Insects*. – 2013. – V. 4. – No. 3. – P. 357-374. – <https://doi.org/10.3390/insects4030357>

11. Lovett B., Leger R. J. S. The insect pathogens // *The Fungal Kingdom*. – 2017. – P. 923-943. – <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch45>
12. Bamisile B. S., Siddiqui J. A., Akutse K. S., Ramos Aguila L. C., Xu, Y. General limitations to endophytic entomopathogenic fungi use as plant growth promoters, pests and pathogens biocontrol agents // *Plants*. – 2021. – V. 10. – No. 10. – P. 2119. – <https://doi.org/10.3390/plants10102119>
13. Butt T. M., Coates C. J., Dubovskiy I. M., Ratcliffe N. A. Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions // *Advances in genetics*. – 2016. – V. 94. – P. 307-364. – <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>
14. Wrońska A. K., Kaczmarek A., Boguś M. I., Kuna A. Lipids as a key element of insect defense systems // *Frontiers in Genetics*. – 2023. – V. 14. – P. 1183659. – <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1183659>
15. Kaczmarek A., Boguś M. I., Włoka E., Wrońska A. K., Krawiel A., Kazek M., Zalewska K., Kłocińska-Biały K., Sobocińska M., Gliniewicz A., Mikulak E., Matławska M. The interaction between cuticle free fatty acids (FFAs) of the cockroaches *Blattella germanica* and *Blatta orientalis* and hydrolases produced by the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* // *PLoS One*. – 2020. – V. 15. – No. 7. – P. e0235785. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235785>
16. Menzel F., Blaimer B. B., Schmitt T. How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2017. – V. 284. – No. 1850. – P. 20161727. – <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2016.1727>
17. Akhanaev Y. B. Tomilova O. G., Yaroslavtseva O. N., Duisembekov B. A., Kryukov V. Y., Glupov V. V. Combined action of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* and avermectins on the larvae of the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say)(Coleoptera, Chrysomelidae) // *Entomological Review*. – 2017. – V. 97. – P. 158-165. – <https://doi.org/10.1134/S0013873817020026>
18. Sergeev M. G. Distribution patterns of grasshoppers and their kin over the Eurasian Steppes // *Insects*. – 2021. – V. 12. – No. 1. – P. 77. – <https://doi.org/10.3390/insects12010077>
19. Sergeev M. G. Ups and downs of the Italian locust (*Calliptamus italicus* L.) populations in the Siberian steppes: On the horns of dilemmas // *Agronomy*. – 2021. – V. 11. – No. 4. – P. 746. – <https://doi.org/10.3390/agronomy11040746>
20. Kryukov V. Y., Lednev G.R., Dubovskiy I.M., Serebrov V.V., Levchenko M.V., Khodyrev V.P., Sagitov A.O., Glupov V.V. New approaches to the biological control of insects by entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycota, Hyphomycetes) // *Eurasian Entomol. J.* – 2007. – Vol. 6. – No. 2. – P. 195-204.

21. Ment D., Gindin G., Rot A., Eshel D., Teper-Bamnolker P., Ben-Ze'ev I., Glazer I., Samish M. Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection // *Biocontrol Science and Technology*. – 2013. – Vol. 23. – No. 8. – P. 956-967. – <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.811217>
22. Lednev G. R., Kryukov V. Y., Khodyrev V. P., Levchenko M. A., Duisembekov B. A., Sagitov A. O., Glupov V. V. Dynamics of mortality of the migratory locust under synchronous infection with entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) and bacteria *Pseudomonas* sp // *Contemporary Problems of Ecology*. – 2008. – V. 1. – P. 210-213. – <https://doi.org/10.1134/S1995425508020069>
23. Kryukov V. Y., Rotskaya U. N., Yaroslavtseva O. N., Noskov Y. A., Glupov V. V. Expression of immunity-and stress-related genes during an intermolt period in the Colorado potato beetle // *Insects*. – 2022. – V. 13. – No. 12. – P. 1168. – <https://doi.org/10.3390/insects13121168>
24. Ment D., Gindin G., Rot A., Soroker V., Glazer I., Barel S., Samish M. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle // *Applied and environmental microbiology*. – 2010. – Vol. 76. – No. 11. – P. 3521-3528. – <https://doi.org/10.1128/AEM.02596-09>
25. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. 736.: илл.
26. Gołębiowski M., Boguś M. I., Paszkiewicz M., Stepnowski P. Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2011. – V. 399. – P. 3177-3191. – <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4439-4>
27. Butt T. M., Jackson C., Magan N. (ed.). *Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential*. – CABI, 2001. – 390 P.
28. Lomer C. J., Bateman R. P., Johnson D. L., Langewald J., Thomas M. Biological control of locusts and grasshoppers // *Annual review of entomology*. – 2001. – V. 46. – No. 1. – P. 667-702. – <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.667>
29. Wigglesworth V. B. Transpiration through the cuticle of insects // *Journal of Experimental Biology*. – 1945. – V. 21. – No. 3-4. – P. 97-114. – <https://doi.org/10.1242/jeb.21.3-4.97>
30. Beament J. W. L. The effect of temperature on the waterproofing mechanism of an insect // *Journal of Experimental Biology*. – 1958. – V. 35. – No. 3. – P. 494-519. – <https://doi.org/10.1242/jeb.35.3.494>
31. Ramsay J. A. The evaporation of water from the cockroach // *Journal of Experimental Biology*. – 1935. – V. 12. – No. 4. – P. 373-383. – <https://doi.org/10.1242/jeb.12.4.373>
32. Gibbs A., Pomonis J. G. Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: the effects of chain length, methyl-branching and unsaturation // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*:

- Biochemistry and Molecular Biology. – 1995. – V. 112. – No. 2. – P. 243-249. – [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00081-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00081-X)
33. Patel S., Nelson D. R., Gibbs A. G. Chemical and physical analyses of wax ester properties // Journal of Insect Science. – 2001. – V. 1. – No. 1. – P. 4. – <https://doi.org/10.1093/jis/1.1.4>
 34. Gibbs A. G. Water-proofing properties of cuticular lipids // American Zoologist. – 1998. – V. 38. – No. 3. – P. 471-482. – <https://doi.org/10.1093/icb/38.3.471>
 35. Gibbs A. G. Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem // Journal of Insect Physiology. – 2002. – V. 48. – No. 4. – P. 391-400. – [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00059-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00059-8)
 36. Young H. P. Larabee J. K., Gibbs A. G., Schal C. Relationship between tissue-specific hydrocarbon profiles and lipid melting temperatures in the cockroach *Blattella germanica* // Journal of Chemical Ecology. – 2000. – V. 26. – No. 5. – P. 1245-1263. – <https://doi.org/10.1023/A:1005440212538>
 37. Sprenger P. P., Burkert L. H., Abou B., Federle W., Menzel F. Coping with the climate: cuticular hydrocarbon acclimation of ants under constant and fluctuating conditions // Journal of Experimental Biology. – 2018. – V. 221. – No. 9. – P. jeb171488. – <https://doi.org/10.1242/jeb.171488>
 38. Taylor A. R., Roubal W. T., Varanasi U. Effects of structural variation in β -monoglycerides and other lipids on ordering in synthetic membranes // Lipids. – 1975. – V. 10. – No. 9. – P. 535-541. – <https://doi.org/10.1007/BF02532356>
 39. Morgan E. D. Biosynthesis in insects. – Royal society of chemistry, 2010.
 40. Small, D.M. (Ed.) Physical Chemistry of Lipids / Handbook of Lipid Research, Plenum Press, New York. – 1986. – V. 4.
 41. Geiselhardt S. F. Lamm S., Gack C., Peschke K. Interaction of liquid epicuticular hydrocarbons and tarsal adhesive secretion in *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) // Journal of Comparative Physiology A. – 2010. – V. 196. – No. 5. – P. 369-378. – <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0522-8>
 42. Gibbs A. G. Thermodynamics of cuticular transpiration // Journal of insect physiology. – 2011. – V. 57. – No. 8. – P. 1066-1069. – <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.05.003>
 43. Markow T. A., Toolson E. C. Temperature effects on epicuticular hydrocarbons and sexual isolation in *Drosophila mojavensis* // Ecological and evolutionary genetics of *Drosophila*. – Springer, Boston, MA, 1990. – P. 315-331. – https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8768-8_21
 44. Gibbs A. G., Chippindale A. K., Rose M. R. Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster* // The Journal of experimental biology. – 1997. – V. 200. – No. 12. – P. 1821-1832. – <https://doi.org/10.1242/jeb.200.12.1821>

45. Hadley N. F., Schultz T. D. Water loss in three species of tiger beetles (*Cicindela*): correlations with epicuticular hydrocarbons // *Journal of insect physiology*. – 1987. – V. 33. – No. 10. – P. 677-682. – [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90050-3)
46. Gibbs A. G., Louie A. K., Ayala J. A. Effects of temperature on cuticular lipids and water balance in a desert *Drosophila*: is thermal acclimation beneficial? // *The Journal of experimental biology*. – 1998. – V. 201. – No. 1. – P. 71-80. – <https://doi.org/10.1242/jeb.201.1.71>
47. McClain E. Seely M. K., Hadley N. F., Gray V. Wax blooms in tenebrionid beetles of the Namib Desert: correlations with environment // *Ecology*. – 1985. – V. 66. – No. 1. – P. 112-118. – <https://doi.org/10.2307/1941311>
48. Rourke B. C. Geographic and altitudinal variation in water balance and metabolic rate in a California grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* // *Journal of experimental Biology*. – 2000. – V. 203. – No. 17. – P. 2699-2712. – <https://doi.org/10.1242/jeb.203.17.2699>
49. Gibbs A., Mousseau T. A., Crowe J. H. Genetic and acclimatory variation in biophysical properties of insect cuticle lipids // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 1991. – V. 88. – No. 16. – P. 7257-7260. – <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7257>
50. Howard R. W., Jackson L. L., Banse H., Blows M. W. Cuticular hydrocarbons of *Drosophila birchii* and *D. serrata*: identification and role in mate choice in *D. serrata* // *Journal of chemical ecology*. – 2003. – V. 29. – No. 4. – P. 961-976. – <https://doi.org/10.1023/A:1022992002239>
51. Hercus M. J., Hoffmann A. A. Desiccation resistance in interspecific *Drosophila* crosses: genetic interactions and trait correlations // *Genetics*. – 1999. – V. 151. – No. 4. – P. 1493-1502. – <https://doi.org/10.1093/genetics/151.4.1493>
52. Chung H., Carroll S. B. Wax, sex and the origin of species: dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating // *BioEssays*. – 2015. – V. 37. – No. 7. – P. 822-830. – <https://doi.org/10.1002/bies.201500014>
53. Gołębiowski M., Paszkiewicz M., Grubba A., Gąsiewska D., Boguś M. I., Włóka E., Wieloch W., Stepnowski P. Cuticular and internal n-alkane composition of *Lucilia sericata* larvae, pupae, male and female imagines: application of HPLC-LLSD and GC/MS-SIM // *Bulletin of Entomological Research*. – 2012. – V. 102. – No. 4. – P. 453-460. – <https://doi.org/10.1017/S0007485311000800>
54. Goodrich B. S. Cuticular lipids of adults and puparia of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Wied.) // *Journal of lipid research*. – 1970. – V. 11. – No. 1. – P. 1-6. – [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)43010-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)43010-X)
55. Hadley N. F. Cuticular lipids of adults and nymphal exuviae of the desert cicada, *Diceroprocta apache* (Homoptera, Cicadidae) // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1980. – V. 65. – No. 3. – P. 549-553. – [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90310-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90310-7)

56. Arnold M. T., Blomquist G. J., Jackson L. L. Cuticular lipids of insects—III. The surface lipids of the aquatic and terrestrial life forms of the big stonefly, *Pteronarcys californica* Newport // *Comparative Biochemistry and Physiology*. – 1969. – V. 31. – No. 5. – P. 685-692. – [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)92068-4](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)92068-4)
57. Baker J. E., Sukkestad D. R., Nelson D. R., Fatland C. L. Cuticular lipids of larvae and adults of the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* // *Insect Biochemistry*. – 1979. – V. 9. – No. 6. – P. 603-611. – [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(79\)90099-4](https://doi.org/10.1016/0020-1790(79)90099-4)
58. Jackson L. L., Arnold M. T., Regnier F. E. Cuticular lipids of adult fleshflies, *Sarcophaga bullata* // *Insect Biochemistry*. – 1974. – V. 4. – No. 4. – P. 369-379. – [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(74\)90074-2](https://doi.org/10.1016/0020-1790(74)90074-2)
59. Gołębiowski M., Maliński E., Nawrot J., Szafranek J., Stepnowski P. Identification of the cuticular lipid composition of the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2007. – V. 147. – No. 2. – P. 288-292. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.01.016>
60. Nelson D. R., Charlet L. D. Cuticular hydrocarbons of the sunflower beetle, *Zygogramma exclamationis* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2003. – V. 135. – No. 2. – P. 273-284. – [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00080-0)
61. Dutra B. K., Fernandes F. A., Nascimento J. C., Quadros F. C., Oliveira G. T. Intermediate metabolism during the ontogenetic development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2007. – V. 147. – No. 3. – P. 594-599. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.08.033>
62. Nestel D., Tolmasky D., Rabossi A., Quesada-Allué L. A. Lipid, carbohydrates and protein patterns during metamorphosis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) // *Annals of the Entomological Society of America*. – 2003. – V. 96. – No. 3. – P. 237-244. – [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2003\)096\[0237:LCAPPD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2003)096[0237:LCAPPD]2.0.CO;2)
63. Chippendale G. M. Metabolic reserves of larvae and pupae of the Angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella* // *Insect Biochemistry*. – 1973. – V. 3. – No. 9. – P. 1-10. – [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(73\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0020-1790(73)90013-9)
64. Merkey A. B., Wong C. K., Hoshizaki D. K., Gibbs A. G. Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster* // *Journal of insect physiology*. – 2011. – V. 57. – No. 10. – P. 1437-1445. – <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.013>
65. Jacob J., Hanssen H. P. The chemical composition of cuticular lipids from dragonflies (Odonata) // *Zeitschrift für Naturforschung C*. – 1979. – V. 34. – No. 7-8. – P. 498-502. – <https://doi.org/10.1515/znc-1979-7-802>

66. Juárez M. P., Brenner R. R., Gros E. G. The epicuticular lipids of *Triatoma infestans*-I. Glycerides // *Comparative Biochemistry and Physiology--Part B: Biochemistry and*. – 1984. – V. 78. – No. 2. – P. 427-431. – [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90053-1](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(84)90053-1)
67. Gołębiowski M., Sosnowska A., Puzyn T., Boguś M. I., Wieloch W., Włóka E., Stepnowski P. Application of two-way hierarchical cluster analysis for the identification of similarities between the individual lipid fractions of *Lucilia sericata* // *Chemistry & Biodiversity*. – 2014. – V. 11. – No. 5. – P. 733-748. – <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300294>
68. Gołębiowski M., Cerkowniak M., Dawgul M., Kamysz W., Boguś M. I., Stepnowski P. The antifungal activity of the cuticular and internal fatty acid methyl esters and alcohols in *Calliphora vomitoria* // *Parasitology*. – 2013. – V. 140. – No. 8. – P. 972-985. – <https://doi.org/10.1017/S0031182013000267>
69. Gołębiowski M., Urbanek A., Oleszczak A., Dawgul M., Kamysz W., Boguś M. I., Stepnowski P. The antifungal activity of fatty acids of all stages of *Sarcophaga carnaria* L.(Diptera: Sarcophagidae) // *Microbiological Research*. – 2014. – V. 169. – No. 4. – P. 279-286. – <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.011>
70. Tillman J. A., Seybold S. J., Jurenka R. A., Blomquist G. J. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 1999. – V. 29. – No. 6. – P. 481-514. – [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00016-8)
71. Blomquist G. (ed.). *Insect pheromone biochemistry and molecular biology: The biosynthesis and detection of pheromones and plant volatiles*. – Elsevier, 2003.
72. Kaczmarek A., Wrońska A. K., Kazek M., Boguś M. I. Metamorphosis-related changes in the free fatty acid profiles of *Sarcophaga (Liopygia) argyrostoma* (Robineau-Desvoidy, 1830) // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10. – No. 1. – P. 17337. – <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74475-1>
73. Jurenka R. A., Subchev M., Abad J.-L., Choi M.-J., Fabrias G. Sex pheromone biosynthetic pathway for disparlure in the gypsy moth, *Lymantria dispar* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – V. 100. – No. 3. – P. 809-814. – <https://doi.org/10.1073/pnas.0236060100>
74. Schal C., Sevala V. L., Young H., Bachmann J. A. S. Sites of synthesis and transport pathways of insect hydrocarbons: cuticle and ovary as target tissues // *American Zoologist*. – 1998. – V. 38. – No. 2. – P. 382-393. – <https://doi.org/10.1093/icb/38.2.382>
75. Blomquist G. J. Biosynthesis and ecdysteroid regulation of housefly sex pheromone production // *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*. – Academic Press, 2003. – P. 231-252.
76. Ng W. C., Chin J. S., Tan K. J., Yew J. Y. The fatty acid elongase *Bond* is essential for *Drosophila* sex pheromone synthesis and male fertility // *Nature communications*. – 2015. – V. 6. – No. 1. – P. 8263. – DOI: 10.1038/ncomms9263

77. Li D. T., Chen X., Wang X. Q., Moussian B., Zhang C. X. The fatty acid elongase gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2019. – V. 108. – P. 32-43. – <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.03.005>
78. MacLean M., Nadeau J., Gurnea T., Tittiger C., Blomquist G.J. Mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) CYP4Gs convert long and short chain alcohols and aldehydes to hydrocarbons // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2018. – V. 102. – P. 11-20. – <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.09.005>
79. Chase J., Jurenka R. A., Schal C., Halarankar P. P., Blomquist G. J. Biosynthesis of methyl branched hydrocarbons of the German cockroach *Blattella germanica* (L.)(Orthoptera, Blattellidae) // *Insect Biochemistry*. – 1990. – V. 20. – No. 2. – P. 149-156. – [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(90\)90007-H](https://doi.org/10.1016/0020-1790(90)90007-H)
80. Blomquist G. J., Chu A. J., Nelson J. H., Pomonis J. G. Incorporation of [2, 3-¹³C] succinate into methyl-branched alkanes in a termite // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1980. – V. 204. – No. 2. – P. 648-650. – [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(80\)90076-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(80)90076-4)
81. Chu A. J., Blomquist G. J. Decarboxylation of tetracosanoic acid to n-tricosane in the termite *Zootermopsis angusticollis*. – 1981. – V. 66. – P. 313–317. – [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90070-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90070-X)
82. Bello J. E., McElfresh J. S., Millar J. G. Isolation and determination of absolute configurations of insect-produced methyl-branched hydrocarbons // *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. – 2015. – V. 112. – N. 4. – P. 1077-1082. – <https://doi.org/10.1073/pnas.1417605112>
83. Boucias D. G., Pendland J. C., Latge J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle // *Applied and environmental microbiology*. – 1988. – V. 54. – No. 7. – P. 1795-1805. – <https://doi.org/10.1128/aem.54.7.1795-1805.1988>
84. Pedrini N., Crespo R., Juárez M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2007. – V. 146. – No. 1-2. – P. 124-137. – <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.003>
85. Gołębowski M., Maliński E., Boguś M. I., Kumirska J., Stepnowski P. The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2008. – V. 38. – P. 619-627. – <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.03.005>
86. Gołębowski M., Cerkowniak M., Boguś M. I., Włóka E., Dawgul M., Kamysz W., Stepnowski P. Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial

- activity // *Journal of Insect Physiology*. – 2013. – V. 59. – No. 4. – P. 416-429. – <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.02.001>
87. Gutierrez A. C., Gołębiowski M., Pennisi M., Peterson G., García J. J., Manfrino R. G., López Lastra C. C. Cuticle fatty acid composition and differential susceptibility of three species of cockroaches to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales) // *Journal of Economic Entomology*. – 2015. – V. 108. – No. 2. – P. 752-760. – <https://doi.org/10.1093/jee/tou096>
88. Sosa-Gomez D. R., Boucias D. G., Nation J. L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* Cuticle and Fungistatic Effect of Cuticular Lipids and Aldehydes // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1997. – V. 69. – No. 1. – P. 31-39. – <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.4619>
89. Napolitano R., Juárez M. P. Entomopathogenous Fungi Degrade Epicuticular Hydrocarbons of *Triatoma infestans* // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1997. – V. 344. – No. 1. – P. 208-214. – <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0163>
90. Crespo R., Juárez M. P., Cafferata L. F. R. Biochemical interaction between entomopathogenous fungi and their insect-host-like hydrocarbons // *Mycologia*. – 2000. – V. 92. – No. 3. – P. 528-536. – <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061189>
91. Crespo R., Juárez M. P., Dal Bello G. M., Padin S., Fernández G. C., Pedrini, N. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana* // *BioControl*. – 2002. – V. 47. – P. 685-696. – <https://doi.org/10.1023/A:1020545613148>
92. Jarrold S. L., Moore D., Potter U., Charnley A. K. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle // *Mycological research*. – 2007. – Vol. 111. – No. 2. – P. 240-249. – <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.10.007>
93. Lecuona R., Riba G., Cassier P., Clement J. L. Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. brongniartii* // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1991. – V. 58. – No. 1. – P. 10-18. – [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90156-K](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90156-K)
94. Paszkiewicz M., Gołębiowski M., Sychowska J., Boguś M. I., Włóka E., Stepnowski P. The effect of the entomopathogenic fungus *C. onidiobolus coronatus* on the composition of cuticular and internal lipids of *B. latta orientalis* females // *Physiological Entomology*. – 2016. – V. 41. – No. 2. – P. 111-120. – <https://doi.org/10.1111/phen.12133>
95. Gołębiowski M., Bojke A., Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Stepnowski P. Comparison of the organic compounds composition of *Hylobius abietis* males and females before and after exposure to *Beauveria bassiana* infection // *Physiological entomology*. – 2020. – V. 45. – No. 1. – P. 81-88. – <https://doi.org/10.1111/phen.12318>

96. Gołębiowski M., Bojke A., Tkaczuk C. Effects of the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii*, *Metarhizium flavoviride*, and *Isaria fumosorosea* on the lipid composition of *Galleria mellonella* larvae // *Mycologia*. – 2021. – V. 113. – No. 3. – P. 525-535. – <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1877520>
97. Gołębiowski M., Urbanek A., Pietrzak A., Naczka A. M., Bojke A., Tkaczuk C., Stepnowski P. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* on the fat body lipid composition of *Zophobas morio* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) // *The Science of Nature*. – 2020. – V. 107. – P. 1-11. – <https://doi.org/10.1007/s00114-019-1662-5>
98. Smith R. J., Grula E. A. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana* // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1982. – V. 39. – No. 1. – P. 15-22. – [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90153-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90153-7)
99. Saito T., Aoki J. Toxicity of Free Fatty Acids on the Larval Surfaces of Two Lepidopterous Insects towards *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. and *Paecilomyces fumoso-roseus* (WIZE) BROWN et SMITH (Deuteromycetes: Moniliales) // *Applied Entomology and Zoology*. – 1983. – V. 18. – No. 2. – P. 225-233. – <https://doi.org/10.1303/aez.18.225>
100. Boguś M. I., Czygier M., Gołębiowski M., Kędra E., Kucińska J., Mazgajska J., Samborski J., Wieloch W., Włóka E. Effects of insect cuticular fatty acids on in vitro growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* // *Experimental Parasitology*. – 2010. – V. 125. – No. 4. – P. 400-408. – <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.001>
101. Uziel A., Kenneth R. G. Survival of primary conidia and capilliconidia at different humidities in *Erynia* (subgen. *Zoophthora*) spp. and in *Neozygites fresenii* (Zygomycotina: Entomophthorales), with special emphasis on *Erynia radicans* // *Journal of invertebrate pathology*. – 1991. – V. 58. – No. 1. – P. 118-126. – [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90169-Q](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90169-Q)
102. Barnes S. E., Moore D. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride* // *Mycological research*. – 1997. – V. 101. – No. 6. – P. 662-666. – <https://doi.org/10.1017/S0953756296003152>
103. Pohl C. H., Kock J. L. F., Thibane V. S. Antifungal free fatty acids: a review // *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. – 2011. – V. 3. – P. 61-71.
104. Carballeira N. M. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents // *Progress in lipid research*. – 2008. – V. 47. – No. 1. – P. 50-61. – <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.10.002>
105. Carballeira N. M., O'Neill R., Parang K. Synthesis and antifungal properties of α -methoxy and α -hydroxyl substituted 4-thiatetradecanoic acids // *Chemistry and physics of lipids*. – 2007. – V. 150. – No. 1. – P. 82-88. – <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.06.218>

106. Wrońska A. K., Boguś M. I., Włóka E., Kazek M., Kaczmarek A., Zalewska K. Cuticular fatty acids of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) inhibit fungal enzymatic activities of pathogenic *Conidiobolus coronatus* // *PLoS One*. – 2018. – V. 13. – No. 3. – P. e0192715. – <https://doi.org/10.1371/journal>
107. Tyurin M. V., Kryukov V. Y., Yaroslavtseva O. N., Elisafenko E. A., Dubovskiy I. M., Glupov V. V. Comparative analysis of immune responses in Colorado potato beetle larvae during development of mycoses caused by *Metarhizium robertsii*, *M. brunneum*, and *M. pempighi* // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2016. – V. 52. – P. 252-260. – <https://doi.org/10.1134/S002209301603008X>
108. Tomilova O. G., Yaroslavtseva 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. – Vol. 116. – P. 106-117. – <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.05.003>
109. Grizanova E. V., Coates C. J., Dubovskiy I. M., Butt T. M. *Metarhizium brunneum* infection dynamics differ at the cuticle interface of susceptible and tolerant morphs of *Galleria mellonella* // *Virulence*. – 2019. – V. 10. – No. 1. – P. 999-1012. – <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1693230>
110. Silberbush A., Markman S., Lewinsohn E., Bar E., Cohen J.E., Blaustein L. Predator-released hydrocarbons repel oviposition by a mosquito // *Ecology Letters*. – 2010. – V. 13. – No. 9. – P. 1129-1138. – <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01501.x>
111. Colazza S., Aquila G., De Pasquale C., Peri E., Millar J. The egg parasitoid *Trissolcus basalis* uses n-nonadecane, a cuticular hydrocarbon from its stink bug host *Nezara viridula*, to discriminate between female and male hosts // *Journal of Chemical Ecology*. – 2007. – V. 33. – P. 1405-1420. – <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9300-7>
112. Schlechter-Helas J., Schmitt T., Peschke K. Learning individual signatures: rove beetle males discriminate unreceptive females by cuticular hydrocarbon patterns // *Animal Behaviour*. – 2012. – N. 84. – P. 369-376. – <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.05.003>
113. Rivault C., Cloarec A., Sreng L. Cuticular extracts inducing aggregation in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) // *Journal of Insect Physiology*. – 1998. – V. 44. – No. 10. – P. 909-918. – [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00062-6)
114. Saïd I., Costagliola G., Leoncini I., Rivault C. Cuticular hydrocarbon profiles and aggregation in four *Periplaneta* species (Insecta: Dictyoptera) // *Journal of insect physiology*. – 2005. – V. 51. – No. 9. – P. 995-1003. – <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.04.017>

115. Heifetz Y., Boekhoff I., Breer H., Applebaum S. W. Cuticular hydrocarbons control behavioural phase transition in *Schistocerca gregaria* nymphs and elicit biochemical responses in antennae // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 1997. – V. 27. – No. 6. – P. 563-568. – [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00031-3)
116. Schlamp K. K., Gries R., Khaskin G., Brown K., Khaskin E., Judd G. J., Gries G. Pheromone components from body scales of female *Anarsia lineatella* induce contacts by conspecific males // *Journal of chemical ecology*. – 2005. – V. 31. – P. 2897-2911. – <https://doi.org/10.1007/s10886-005-8402-3>
117. Braga M. V., Pinto Z. T., de Carvalho Queiroz M. M., Blomquist G. J. Effect of age on cuticular hydrocarbon profiles in adult *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) // *Forensic science international*. – 2016. – V. 259. – P. e37-e47. – <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.11.006>
118. Moore H. E., Adam C. D., Drijfhout F. P. Potential Use of Hydrocarbons for Aging *L. ucilia sericata* Blowfly Larvae to Establish the Postmortem Interval // *Journal of forensic sciences*. – 2013. – V. 58. – No. 2. – P. 404-412. – <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12016>
119. Dani F. R., Jones G. R., Destri S., Spencer S. H., Turillazzi S. Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps // *Animal Behaviour*. – 2001. – V. 62. – No. 1. – P. 165-171. – <https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1714>
120. Oystaeyen A. V., Oliveira R. C., Holman L., Zweden J. S., Romero C., Oi C. A., d'Ettorre P., Khalesi M., Billen J., Wäckers F., G. Millar J., Wenseleers T. Conserved Class of Queen Pheromones Stops Social Insect Workers from Reproducing // *Science*. – 2014. – Vol. 343. – P. 287-280. – <https://doi.org/10.1126/science.1244899>
121. Spencer K. C. (ed.). *Chemical mediation of coevolution*. – Elsevier, 2013.
122. Ткачев А. В. Исследование летучих веществ растений. – Новосибирск: Издательско-полиграфическое предприятие «Офсет», 2008. – 969 с.
123. Hughes G.P., Bello J. E., Millar J.G., Ginzl M. D. Determination of the absolute configuration of female-produced contact sex pheromone components of the longhorned beetle, *Neoclytus acuminatus acuminatus* (F) // *Journal of chemical ecology*. – 2015. – V. 41. – P. 1050-1057. – <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0639-x>
124. Ablard K., Gries R., Khaskin G., Schaefer P.W., Gries G. Does the stereochemistry of methylated cuticular hydrocarbons contribute to mate recognition in the egg parasitoid wasp *Ooencyrtus kuvanae*? // *Journal of Chemical Ecology*. – 2012. – V. 38. – P. 1306-1317. – <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0189-4>
125. Chow S., Koenig W. A., Kitching W. Synthesis and Enantioselective Gas Chromatography of Stereoisomers of 7,11-Dimethylheptadecane – A Pheromone Component of *Lambdina* Species //

- European Journal of Organic Chemistry. – 2004. – V. 2004. – No. 6. – P. 1198-1201. – <https://doi.org/10.1002/ejoc.200300643>
126. Duff C. M., Gries G., Mori K., Shirai Y., Seki M., Takikawa H., Sheng T., Slessor K.N., Gries R., Maier C. T., Ferguson D. C. Does pheromone biology of *Lambdina athasaria* and *L. pellucidaria* contribute to their reproductive isolation? // *Journal of chemical ecology*. – 2001. – V. 27. – P. 431-442. – <https://doi.org/10.1023/A:1010324519127>
127. Dubis E., Poplawski J., Wrobel J. T., Kusmierz J., Malinski E., Szafranek J. Analysis of Exoskeleton Triglycerides of *Leptinotarsa decemlineata* Say // *LIPIDS*. – 1986. – V. 21. – No. 7. – P. 434-439. – <https://doi.org/10.1007/BF02536399>
128. Yocum G.D., Rinehart J.P., Chirumamilla-Chapara A., Larson M.L. Characterization of gene expression patterns during the initiation and maintenance phases of diapause in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* // *Journal of Insect Physiology*. – 2009. – V. 55. – No. 1. – P. 32-39. - <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.10.003>
129. Güney G., Toprak U., Hegedus D. D., Bayram Ş., Coutu C., Bekkaoui D., Baldwin D., Heckel D. G., Hanniger S., Cedden D., Mutlu D. A., Suludere Z. A look into Colorado potato beetle lipid metabolism through the lens of lipid storage droplet proteins // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. – 2021. – V. 133. – P. 103473. – <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103473>
130. Сикура А.И., Сикура Л.В. Энтомопатогены – грибы, бактерии, простейшие, нематоды // Колорадский картофельный жук *Leptinotarsa decemlineata* Say. Филогения, морфология, физиология, адаптация, естественные враги / Под ред. Р.С. Ушатинской. М.: Наука, 1981. С. 299–13.
131. Kryukov V., Yaroslavtseva O., Tyurin M., Akhanaev Y., Elisaphenko E., Wen T. C., Tomilova O., Tokarev Y., Glupov V. Ecological preferences of *Metarhizium* spp. from Russia and neighboring territories and their activity against Colorado potato beetle larvae // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2017. – V. 149. – P. 1-7. – <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.07.001>
132. Цыпленков Е. П. Вредные саранчовые насекомые в СССР. Л.: Колос. 271 с. – 1970.
133. Lecoq M., Long Z. Migratory Locust *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Acrididae) // *Encyclopedia of Pest Orthoptera of the World*. – 2019. – P.119-128.
134. Лачининский А. В., Сергеев М. Г., Чильдебаев М. К., Черняховский М. Е., Локвуд Д. А., Камбулин В. Е., Гаппаров Ф. А. Саранчовые Казахстана, Средней Азии и сопредельных территорий // Ларами: Международная Ассоциация Прикладной Акридологии и Университет Вайоминга. – 2002. – С. 387.
135. Genin E., Jullien R., Perez F., Fuzeau-Braesch S. Cuticular hydrocarbons of gregarious and solitary locusts *Locusta migratoria cinerascens* // *Journal of chemical ecology*. – 1986. – V. 12. – P. 1213-1238. – <https://doi.org/10.1007/BF01012343>

136. Vötsch W., Nicholson G., Müller R., Stierhof Y. D., Gorb S., Schwarz U. Chemical composition of the attachment pad secretion of the locust *Locusta migratoria* // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2002. – V. 32. – No. 12. – P. 1605-1613. – [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00098-X)
137. Orahá V. S., Lockety K. H. Cuticular lipids of *Locusta migratoria migratorioides* (R and F), *Schistocerca gregaria* (Forskål)(Acrididae) and other orthopteran species-I. Polar components. – 1990. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1990. – V. 95B. – No. 3. – P. 603-608.
138. Rose D. J. W., Dewhurst C. F., Page W. W., Fishpool L. D. C. The role of migration in the life system of the African armyworm *Spodoptera exempta* // *International Journal of Tropical Insect Science*. – 1987. – V. 8. – No. 4-5-6. – P. 561-569. – <https://doi.org/10.1017/S174275840002261X>
139. Haile A., Ali K. A review of research on the control of insect pests of small cereals in Ethiopia // *A review of crop protection research in Ethiopia. Proceedings of the First Ethiopian Crop Protection Symposium*. – 1985. – P. 57-75.
140. Lockety K. H. Cuticular hydrocarbons of *Locusta*, *Schistocerca*, and *Periplaneta*, and their role in waterproofing // *Insect Biochemistry*. – 1976. – V. 6. – No. 5. – P. 457-472. – [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(76\)90068-8](https://doi.org/10.1016/0020-1790(76)90068-8)
141. Grunshaw J. P., Guermouche H., Guermouche S., Jago N. D., Jullien R., Knowles E., Perez, F. Chemical taxonomic studies of cuticular hydrocarbons in locusts of the *Schistocerca americana* complex (Acrididae: Cyrtacanthacridinae): chemical relationships between New World and Old World species // *Journal of chemical ecology*. – 1990. – V. 16. – P. 2835-2858. – <https://doi.org/10.1007/BF00979477>
142. Levchenko M. V., Kononchuk A. G., Gerus A. V., Lednev G. R. Differential susceptibility of *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) to infection with entomopathogenic fungi // *Вестник защиты растений*. – 2020. – Т. 103. – № 2. – С. 150-152. – <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-2-13364>
143. Химия ароматических, гетероциклических и природных соединений (НИОХ СО РАН 1958-2008 гг.) / Григорьев И.А., Власов В.М., Штейнгарц В.Д. и др; отв. редактор Пармон В.Н.: Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Новосиб. ин-т органической химии. – Новосибирск: ЗАО ИПП «Офсет», 2009. – 872 с.
144. Зенкевич И. Г. Принцип структурной аналогии при расчете газохроматографических индексов удерживания по физико-химическим свойствам органических соединений // *Журнал аналитической химии*. – 1998. – Т. 53. – № 1. – С. 43-49.
145. Carlson D. A., Bernier U. R., Sutton B. D. Elution patterns from capillary GC for methyl-branched alkanes // *Journal of Chemical Ecology*. – 1998. – V. 24. – P. 1845-1865. – <https://doi.org/10.1023/A:1022311701355>

146. Ruther J., Döring M., Steiner S. Cuticular hydrocarbons as contact sex pheromone in the parasitoid *Dibrachys cavus* // *Entomologia Experimentalis et Applicata*. – 2011. – N 140. – P. 59-68. – <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01129.x>
147. Вульфсон Н. С., Заикин В. Г., Микая А. И. Масс-спектрокопия органических соединений. – М.: Химия, 1986. – 312 с.
148. Watson J. T., Sparkman O. D. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*. – John Wiley & Sons, Ltd, 2007. – 854 p. Fourth Edition.
149. Nelson D. R., Olson D. L., Fatland C. L. Cuticular hydrocarbons of the flea beetles, *Aphthona lacertosa* and *Aphthona nigricutis*, biocontrol agents for leafy spurge (*Euphorbia esula*) // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2002. – V. 133. – No. 3. – P. 337-350. – [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00161-6)
150. Lange C., Basselier J.-J., Bagnères A.-G., Escoubas P., Lemaire M., Lenoir A., Clement J.-L., Bonavita-Cougourdan A., Trabalon M., Campan M. Strategy for the Analysis of Cuticular Hydrocarbon Waxes from Insects Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Electron Impact and Chemical Ionization // *Biomed. Env. Mass Spectrom.* – 1989. – V. 18. – P.787-800. – <https://doi.org/10.1002/bms.1200180924>
151. Ando T., Yamakawa R. Chiral methyl-branched pheromones // *Natural product reports*. – 2015. – V. 32. – No. 7. – P. 1007-1041. – <https://doi.org/10.1039/C4NP00138A>
152. Millar J. G. *Chemical synthesis of insect cuticular hydrocarbons*. – Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2010. – P. 163-186.
153. Nelson D.R., Fatland C.L., Howard R.W., McDaniel C.A., Blomquist G.J. Re-analysis of the cuticular methylalkanes of *Solenopsis invicta* and *S. richteri* // *Insect biochemistry*. – 1980. – V. 10. – No. 4. – P. 409-418. – [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(80\)90012-8](https://doi.org/10.1016/0020-1790(80)90012-8)
154. Haverty M. I., Nelson L. J., Page M. Cuticular hydrocarbons of four populations of *Coptotermes formosanus* Shiraki in the United States: similarities and origins of introductions // *Journal of chemical ecology*. – 1990. – V. 16. – P. 1635-1647. – <https://doi.org/10.1007/BF01014096>
155. Gries G., Gries R., Krannitz S.H., Li J., King G. S., Slessor K. N., Borden J. H., Bowers W. W., West R. J., Underhill E. W. Sex pheromone of the western hemlock looper, *Lambdina fiscellaria lugubrosa* (Hulst)(Lepidoptera: Geometridae) // *Journal of chemical ecology*. – 1993. – V. 19. – P. 1009-1019. – <https://doi.org/10.1007/BF00992534>
156. Gries G., Gries R., Borden J.H., Li J., Slessor K. N., King G. G. S., Bowers W. W., West R. J., Underhill E. W. 5,11-Dimethylheptadecane and 2,5-Dimethylheptadecane: Sex Pheromone

- Components of the Geometrid Moth, *Lambdina fiscellaria fiscellaria* // *ChemInform.* – 1991. – V. 22. – No. 43. P. 315-317. – <https://doi.org/10.1002/chin.199143241>
157. Charlton R. E., Roelofs W. L. Biosynthesis of a volatile, methyl-branched hydrocarbon sex pheromone from leucine by arctiid moths (*Holomelina* spp.) // *Archives of insect biochemistry and physiology.* – 1991. – V. 18. – No. 2. – P. 81-97. – <https://doi.org/10.1002/arch.940180203>
158. Maliński E., Kusmierz J., Szafranek J., Dubis E., Poplawski J., Wróbel J.T., König W.A. Cuticular Hydrocarbons of the Colorado Beetle *Leptinotarsa decemlineata* say // *Z. Naturforsch.* – 1986. – N 41b. – P. 567—574. – <https://doi.org/10.1515/znb-1986-0507>
159. 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>
160. Kryukov V. Y. Yaroslavtseva O. N., Lednev G. R., Borisov B. A. Local epizootics caused by teleomorphic cordycipitoid fungi (Ascomycota: Hypocreales) in populations of forest lepidopterans and sawflies of the summer-autumn complex in Siberia // *Microbiology.* – 2011. – V. 80. – P. 286-295. – <https://doi.org/10.1134/S0026261711020093>
161. Koukos D., Meletiou-Christou M. S., Rhizopoulou S. Leaf surface wettability and fatty acid composition of *Arbutus unedo* and *Arbutus andrachne* grown under ambient conditions in a natural macchia // *Acta Botanica Gallica.* – 2015. – V. 162. – No. 3. – P. 225-232. – <https://doi.org/10.1080/12538078.2015.1039579>
162. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. – М., 2015. Т.1. – 1470 С.
163. Akino T. Cuticular hydrocarbons of *Formica truncorum* (Hymenoptera: Formicidae): description of new very long chained hydrocarbon components // *Applied Entomology and Zoology.* – 2006. – V. 41. – No. 4. – P. 667-677. – <https://doi.org/10.1303/aez.2006.667>
164. Page M., Nelson L. J., Haverty M. I., Blomquist G. J. Cuticular hydrocarbons of eight species of North American cone beetles, *Conophthorus* Hopkins // *Journal of chemical ecology.* – 1990. – V. 16. – P. 1173-1198. – <https://doi.org/10.1007/BF01021018>
165. Sutton B. D., Carlson D. A. Cuticular hydrocarbons of *Glossina*, III: subgenera *Glossina* and *Nemorhina* // *Journal of Chemical Ecology.* – 1997. – No. 23. – P. 1291-1320. – <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006465.90735.a0>
166. Jurenka R. A., Subchev M. Identification of Cuticular Hydrocarbons and the Alkene Precursor to the Pheromone in Hemolymph of the Female Gypsy Moth, *Lymantria dispar* // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* N 43. – 2000. – P.108–115. – [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(200003\)43:3%3C108::AID-ARCH2%3E3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(200003)43:3%3C108::AID-ARCH2%3E3.0.CO;2-V)

167. Howard R. W., Baker J. E. Cuticular Hydrocarbons and Wax Esters of the Ectoparasitoid *Habrobracon hebetor*: Ontogenetic, Reproductive, and Nutritional Effects // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. – 2003. – V. 53. – No. 1. – P. 1–18. – <https://doi.org/10.1002/arch.10078>
168. Haverty M. I., Page M., Nelson L. J., Blomquist G. J. Cuticular hydrocarbons of dampwood termites, *Zootermopsis*: Intra- and Intercolony Variation and Potential as Taxonomic Characters // *Journal of Chemical Ecology*. – 1988. – V. 14. – P. 1035-1058. – <https://doi.org/10.1007/BF01018791>
169. Szafranek J., Maliński E., Dubis E., Hebanowska E., Nawrot J., Oksman P., Pihlaja K. Identification of branched alkanes in lipids of *Leptinotarsa decemlineata* say and *Tribolium destructor* by GC-MS: A comparison of main-beam and link-scanned spectra // *Journal of Chemical Ecology*. – 1994. – V. 20. – P. 2197-2212. – <https://doi.org/10.1007/BF02033197>
170. Caputo B., Dani F. R., Horne G. L., Petrarca V., Turillazzi S., Coluzzi M., Priestman A. A., della Torre A. Identification and composition of cuticular hydrocarbons of the major Afrotropical malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae): analysis of sexual dimorphism and age-related changes // *J. Mass Spectrom.* – 2005. – V. 40. – P. 1595–1604. – <https://doi.org/10.1002/jms.961>
171. Hadley N. F., Jackson L. L., Leader J. Cuticular hydrocarbons of the New Zealand alpine weta *Hemideina maori* (Orthoptera, Stenopelmatidae) // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1988. – V. 91B. – No. 4. – P. 685-689. – [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90192-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90192-7)
172. Howard R. W., Lord J. C. Cuticular lipids of the booklouse, *Liposcelis bostrychophila*: Hydrocarbons, aldehydes, fatty acids, and fatty acid amides // *Journal of chemical ecology*. – 2003. – V. 29. – P. 615-627. – <https://doi.org/10.1023/A:1022806922246>
173. Howard R. W., Blomquist G. J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons // *Annu. Rev. Entomol.* – 2005. – V. 50. – P. 371-393. – <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359>
174. Nelson D. R., Blomquist G. J. Insect waxes // *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. – 1995. – P. 1–90.
175. Hammer O. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontol electron.* – 2001. – V. 4. – P. 9.
176. Alyokhin A., Kryukov V. Ecology of a potato field // *Insect Pests of Potato*. – Academic Press, 2022. – P. 451-462. – <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821237-0.00003-2>
177. Hajek A. E., Eastburn C. C. Attachment and germination of *Entomophaga maimaiga* conidia on host and non-host larval cuticle // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2003. – V. 82. – No. 1. – P. 12-22. – [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00198-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00198-2)

178. Lin L., Fang W., Liao X., Wang F., Wei D., St. Leger R. J. The MrCYP52 cytochrome P450 monooxygenase gene of *Metarhizium robertsii* is important for utilizing insect epicuticular hydrocarbons // *PloS one*. – 2011. – V. 6. – No. 12. – P. e28984. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028984>
179. Noskov Y. A., Yaroslavtseva O. N., Tolokonnikova K. P., Zhangissina S., Kryukov V. Y. An Experimental Study on Colorado Potato Beetle Hibernation Under Natural Conditions // *Journal of Visualized Experiments*. – 2023. – No. 201. – P. e65862. – doi:10.3791/65862
180. Crespo R., Pedrini N., Juárez M. P., Dal Bello G. M. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* // *Microbiological research*. – 2008. – V. 163. – No. 2. – P. 148-151. – <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.013>
181. Gao Q., Shang Y., Huang W., Wang C. Glycerol-3-phosphate acyltransferase contributes to triacylglycerol biosynthesis, lipid droplet formation, and host invasion in *Metarhizium robertsii* // *Applied and environmental microbiology*. – 2013. – V. 79. – No. 24. – P. 7646-7653. – <https://doi.org/10.1128/AEM.02905-13>
182. Gao Q., Lu Y., Yao H., Xu Y. J., Huang W., Wang C. Phospholipid homeostasis maintains cell polarity, development and virulence in *Metarhizium robertsii* // *Environmental Microbiology*. – 2016. – V. 18. – No. 11. – P. 3976-3990. – <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13408>
183. Ma M., Luo J., Li C., Eleftherianos I., Zhang W., Xu, L. A life-and-death struggle: interaction of insects with entomopathogenic fungi across various infection stages // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – V. 14. – P. 1329843. – <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1329843>
184. Liu F., Huang W., Wu K., Qiu Z., Huang Y., Ling E. Exploiting innate immunity for biological pest control // *Advances in insect physiology*. – 2017. – V. 52. – P. 199-230. – <https://doi.org/10.1016/bs.aaip.2017.02.001>
185. Chaurasia A., Lone Y., Wani O., Gupta U. S. Effect of certain entomopathogenic fungi on oxidative stress and mortality of *Periplaneta americana* // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 2016. – V. 127. – P. 28-37. – <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.09.002>
186. Kumari S., Verma D., Kumar D. Evaluation of *Aspergillus niger* as a Biocontrol Agent in the Insect Pest Management of Red Cotton Bug, *Dysdercus koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) // *Journal of Scientific Research*. – 2019. – V. 11. – No. 2. – P. 235–247. – <http://dx.doi.org/10.3329/jsr.v11i2.39286>
187. Kaur M., Chadha P., Kaur S., Kaur A. *Aspergillus flavus* induced oxidative stress and immunosuppressive activity in *Spodoptera litura* as well as safety for mammals // *BMC microbiology*. – 2021. – V. 21. – No. 1. – P. 180. – <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02249-4>
188. Shamakhi L., Zibae A., Karimi-Malati A., Hoda H. Simultaneous effects of thermal stress and fungal infection on lipid peroxidation and antioxidant system of rice-striped stem borer, *Chilo*

- suppressalis Walker (Lepidoptera: Crambidae) // *Biological Rhythm Research*. – 2020. – V. 51. – No. 2. – P. 225-237. – <https://doi.org/10.1080/09291016.2018.1526500>
189. Ahmed A. M. Lipid peroxidation and oxidative protein products as biomarkers of oxidative stress in the autogenous mosquito, *Aedes caspius*, upon infection with the mosquitocidal bacterium, *Bacillus thuringiensis kurstaki*. – 2012. – V. 44. – No. 2. – P. 525–536.
190. Azzi A. Oxidative stress: what is it? Can it be measured? Where is it located? Can it be good or bad? Can it be prevented? Can it be cured? // *Antioxidants*. – 2022. – V. 11. – No. 8. – P. 1431. – <https://doi.org/10.3390/antiox11081431>
191. Gaschler M. M., Stockwell B. R. Lipid peroxidation in cell death // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2017. – V. 482. – No. 3. – P. 419-425. – <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
192. Kim Y., Stanley D. Eicosanoid signaling in insect immunology: new genes and unresolved issues // *Genes*. – 2021. – V. 12. – No. 2. – P. 211. – <https://doi.org/10.3390/genes12020211>
193. Dean P., Gadsden J. C., Richards E. H., Edwards J. P., Charnley A. K., Reynolds S. E. Modulation by eicosanoid biosynthesis inhibitors of immune responses by the insect *Manduca sexta* to the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2002. – V. 79. – No. 2. – P. 93-101. – [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00014-9)
194. Lord J. C., Anderson S., Stanley D. W. Eicosanoids mediate *Manduca sexta* cellular response to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*: a role for the lipoxygenase pathway // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*. – 2002. – V. 51. – No. 1. – P. 46-54. – <https://doi.org/10.1002/arch.10049>
195. Roy M. C., Kim Y. Toll signal pathway activating eicosanoid biosynthesis shares its conserved upstream recognition components in a lepidopteran *Spodoptera exigua* upon infection by *Metarhizium rileyi*, an entomopathogenic fungus // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2022. – V. 188. – P. 107707. – <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107707>
196. Shrestha S., Kim Y. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua* // *Insect biochemistry and molecular biology*. – 2008. – V. 38. – No. 1. – P. 99-112. – <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.09.013>
197. Jurenka R. A., Schal C., Burns E., Chase J., Blomquist G. J. Structural correlation between cuticular hydrocarbons and female contact sex pheromone of German cockroach *Blattella germanica* (L.) // *Journal of Chemical Ecology*. – 1989. – V. 15. – P. 939-949. – <https://doi.org/10.1007/BF01015189>
198. Schal C., Burns E. L., Jurenka R. A., Blomquist G. J. A new component of the female sex pheromone of *Blattella germanica* (L.)(Dictyoptera: Blattellidae) and interaction with other

- pheromone components // *Journal of Chemical Ecology*. – 1990. – V. 16. – P. 1997-2008. – <https://doi.org/10.1007/BF01020511>
199. Chase J., Touhara K., Prestwich G. D., Schal C., Blomquist G. J. Biosynthesis and endocrine control of the production of the German cockroach sex pheromone 3, 11-dimethylnonacosan-2-one // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1992. – V. 89. – No. 13. – P. 6050-6054. – <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6050>
200. Ahmad S., Kirkland K. E., Blomquist G. J. Evidence for a sex pheromone metabolizing cytochrome P-450 mono-oxygenase in the housefly // *Archives of insect biochemistry and physiology*. – 1987. – V. 6. – No. 2. – P. 121-140. – <https://doi.org/10.1002/arch.940060206>
201. Verbruggen E. M. J., Hermens J. L. M., Tolls J. Physicochemical properties of higher nonaromatic hydrocarbons: A literature study // *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. – 2000. – V. 29. – No. 6. – P. 1435-1446. – <https://doi.org/10.1063/1.1347983>
202. Kassa A. Development and testing of mycoinsecticides based on submerged spores and aerial conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of locusts, grasshoppers and storage pest. – Cuvillier Verlag, 2003.
203. 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
204. Howard R. W., Liang Y. S. Cuticular hydrocarbons of winged and wingless morphs of the ectoparasitoid *Choetospila elegans* Westwood (Hymenoptera: Pteromalidae) and its host, larval lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*) (Coleoptera: Bostrichidae). – 1993. – V. 106. – No.2 – P. 407-414. – [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90321-U](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90321-U)
205. Lockey K. H. The adult cuticular hydrocarbons of *Tenebrio molitor* L. and *Tenebrio obscurus* F.(Coleoptera: Tenebrionidae) // *Insect Biochemistry* – 1978. – V. 8. – No.4. – P. 237-250. – [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(78\)90032-X](https://doi.org/10.1016/0020-1790(78)90032-X)
206. Golden K. L., Meinke L. J., Stanley-Samuelson D. W. Cuticular hydrocarbon discrimination of *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) sibling species // *Annals of the Entomological Society of America*. – 1992. – V. 85. – No. 5. – P. 561-570. – <https://doi.org/10.1093/aesa/85.5.561>
207. Nelson D. R. Discovery of novel trimethylalkanes in the internal hydrocarbons of developing pupae of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2001. – V. 128. – No. 4. – P. 647-659. – [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(00\)00336-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00336-5)

208. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. – Введ. 23.04.01. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2002. – 32 с.
209. ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике. – Введ. 23.04.01. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2002. – 51 с.
210. РМГ 61-2010. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – М.: Стандартинформ, 2012. – 63 с.
211. Образовский Е. Г. Основы химической метрологии: Учеб. Пособие. – Новосибирск.: Новосиб. гос. ун-т, 2012. – 180 с.
212. Дерффель К. Статистика в аналитической химии: пер. с нем. – М.: Мир, 1994. – 268 с.
213. ОФС.1.2.1.2.0001.15. Общая фармакопейная статья. Хроматография. – Введ. 01.01.16. – 28 с.
214. ОФС.1.2.1.2.0001.15. Общая фармакопейная статья. Валидация аналитических методик. – Введ. 01.01.16. – 13 с.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Содержание углеводов в пересчете на массу экстракта и см² поверхности в эпикутикуле личинок колорадского жука (По 5 повторностей для свежеперелинявших и промежуточных личинок, 6 повторностей для заканчивающих питание личинок)

№ пика	Структура	Брутто-формула	Содержание, % от экстракта			Содержание, мкг/см ² поверхности личинки		
			4-6 ч после линьки	34-36 ч после линьки	94-96 ч после линьки	4-6 ч после линьки	34-36 ч после линьки	94-96 ч после линьки
1	2,6-диметилгексакозан	C ₂₈ H ₅₈	0.77 ± 0.13	0.47 ± 0.08	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.07 ± 0.01
2	10-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	1.04 ± 0.14	0.76 ± 0.07	0.54 ± 0.12	0.36 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.13 ± 0.03
3	2- или 4-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	7.57 ± 1.14	5.86 ± 0.78	4.12 ± 0.75	2.59 ± 0.19	2.01 ± 0.28	1.00 ± 0.23
4	2,10- или 2,18-диметилоктакозан	C ₃₀ H ₆₂	14.34 ± 2.18	12.57 ± 1.69	10.44 ± 1.89	4.90 ± 0.35	4.22 ± 0.56	2.54 ± 0.57
5	2,6- диметилоктакозан	C ₃₀ H ₆₂	21.16 ± 3.26	18.58 ± 2.50	15.22 ± 2.44	7.18 ± 0.58	6.24 ± 0.83	3.71 ± 0.75
6	2,10,16-триметилоктакозан	C ₃₁ H ₆₄	6.63 ± 1.07	5.05 ± 0.69	3.98 ± 0.69	2.23 ± 0.19	1.71 ± 0.23	0.97 ± 0.21
	2,10,18-триметилоктакозан	C ₃₁ H ₆₄						
7	11-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	9.69 ± 1.45	8.42 ± 1.24	6.59 ± 0.99	3.32 ± 0.26	2.83 ± 0.43	1.61 ± 0.31
8	11,17-диметилнонакозан	C ₃₁ H ₆₂	3.74 ± 0.60	3.11 ± 0.36	2.02 ± 0.30	1.26 ± 0.13	1.05 ± 0.12	0.49 ± 0.09
	11,19-диметилнонакозан	C ₃₁ H ₆₄						
9	12-метилтриаконтан	C ₃₁ H ₆₄	1.97 ± 0.30	1.35 ± 0.19	1.00 ± 0.22	0.70 ± 0.09	0.45 ± 0.06	0.24 ± 0.06
10	2- или 4-метилтриаконтан	C ₃₁ H ₆₄	1.94 ± 0.42	1.06 ± 0.08	1.02 ± 0.15	0.65 ± 0.15	0.36 ± 0.03	0.25 ± 0.04
11	2,12- или 2,18-диметилтриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	1.13 ± 0.18	1.32 ± 0.30	0.69 ± 0.18	0.40 ± 0.03	0.41 ± 0.09	0.17 ± 0.05
12	2,6-диметилтриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	2.01 ± 0.47	1.49 ± 0.29	1.51 ± 0.31	0.60 ± 0.08	0.50 ± 0.10	0.37 ± 0.09
13	13-метилгентриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	0.73 ± 0.13	0.62 ± 0.08	0.44 ± 0.10	0.25 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.11 ± 0.03

Приложение 1. Продолжение. Содержание углеводов в пересчете на массу экстракта и см² поверхности в эпикутикуле личинок колорадского жука (По 5 повторностей для свежеперелинявших и промежуточных личинок, 6 повторностей для заканчивающих питание личинок)

	Содержание, % от экстракта			Содержание, мкг/см ² поверхности личинки		
	4-6 ч после линьки	34-36 ч после линьки	94-96 ч после линьки	4-6 ч после линьки	34-36 ч после линьки	94-96 ч после линьки
Сумма:	69.6±3.6	65.6±5.0	46.6±2.9	24.7±2.0	20.4±2.7	11.6±2.4

Приложение 2. Содержание свободных кислот в пересчете на массу экстракта в эпикутикуле личинок колорадского жука (По 5 повторностей для свежеперелинявших и заканчивающих питание личинок, 4 повторности для промежуточных)

№	Название	Структура	Содержание, % от экстракта		
			4-6 ч	34-36 ч	84-86 ч
1	Пальмитиновая	C16:0	1.45±0.17	2.57±0.67	1.98±0.33
2	Линолевая кислота	C18:2	0.51±0.10	0.76±0.18	0.49±0.07
3	Линоленовая кислота	C18:1	0.17±0.06	0.33±0.04	0.49±0.10
4	Олеиновая кислота	C18:3	0.73±0.14	1.01±0.37	0.82±0.20
5	Стеариновая кислота	C18:0	0.63±0.12	0.70±0.22	0.66±0.13
Сумма:			3.50±0.48	5.38±1.24	4.45±0.71

Приложение 3. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле личинок IV возраста, куколках и имаго колорадского жука. По 5 биологических повторностей в каждой фазе. Одна повторность = 80 насекомых для личинок и куколок, 40 насекомых для имаго

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, <i>m/z</i>	M+	Структура	Брутто-формула	Содержание, мкг/мг экстракта		
							Личинки	Куколки	Имаго
1	98.49	2696	112/113, 308/309	394	2,6-диметилгексакозан	C ₂₈ H ₅₈	13.7±0.9	6.7±1.3	5.7±1.5
2	99.53	2726	196/197, 224/225	394	13-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	-	5.7±1.1	0.8±0.1
3	101.94	2797	112/113, 322/323	408	7-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	7.6±0.9	8.2±1.0	2.4±0.3
4	103.04	2830	154/155, 280/281	408	10-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	11.5±1.1	9.4±0.9	1.8±0.2
5	104.03	2860	364/365, 392/393	408	4- и/или 2-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	105.3±1.0	47.6±2.4	35.4±1.7
6	105.18	2894	168/169, 280/281	422	2,10- и/или 2,18-диметилоктакозан	C ₃₀ H ₆₂	159.5±9.7	136.4±6.0	40.0±2.8
7	105.46	2903	112/113, 336/337	422	2,6-диметилоктакозан	C ₃₀ H ₆₂	214.1±9.2	230.1±15.4	134.9±6.0
8	106.06	2922	168/169, 196/197, 266/267, 294/295	436	2,10,16-триметилоктакозан	C ₃₁ H ₆₄	95.9±1.3	68.3±5.4	34.7±1.2
	106.14	2924	168/169, 294/295	436	2,10,18-триметилоктакозан	C ₃₁ H ₆₄			
9	106.35	2931	168/169, 280/281	422	11-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	88.8±3.5	75.1±4.0	40.9±1.8
10	107.23	2958	168/169, 196/197, 266/267, 294/295	436	11,17-диметилнонакозан*	C ₃₁ H ₆₄	41.2±1.1	30.4±4.3	22.3±0.9
	107.33	2961	168/169, 294/295	436	11,19-диметилнонакозан	C ₃₁ H ₆₄			
11	108.39	2994	112/113, 350/351	436	2,23-диметилнонакозан*	C ₃₁ H ₆₄	-	-	4.5±0.3
12	109.47	3029	182/183, 280/281	436	12-метилтриаконтан	C ₃₁ H ₆₄	11.1±1.0	10.9±1.0	5.1±0.3
13	110.48	3062	392/393, 420/421	436	4- и/или 2-метилтриаконтан	C ₃₁ H ₆₄	14.8±0.7	55.0±5.6	80.6±2.2
14	111.35	3090	196/197, 280/281	450	2,12- и/или 2,18-диметилтриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	33.5±3.1	43.8±3.2	29.0±0.6
	111.40	3091	168/169, 308/309	450	2,10-диметилтриаконтан	C ₃₂ H ₆₆			
15	111.67	3100	112/113, 364/365	450	2,6-диметилтриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	17.7±1.6	32.0±3.4	48.2±1.0

Приложение 3. Продолжение. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле личинок IV возраста, куколках и имаго колорадского жука. По 5 биологических повторностей в каждой фазе. Одна повторность = 80 насекомых для личинок и куколок, 40 насекомых для имаго

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	M+	Структура	Брутто-формула	Содержание, мкг/мг экстракта		
							Личинки	Куколки	Имаго
16	112.09	3114	196/197, 224/225, 266/267, 294/295	464	2,12,16-триметилтриаконтан	$C_{33}H_{68}$	10.2±0.7	20.0±2.6	13.3±0.1
	112.22	3118	168/169, 224/225, 266/267, 322/323	464	2,10,16-триметилтриаконтан	$C_{33}H_{68}$			
17	112.22	3128	196/197, 280/281	450	13-метилгентриаконтан	$C_{32}H_{66}$	13.0±1.4	22.0±2.6	25.7±0.7
18	113.45	3159	168/169, 196/197, 294/295, 322/323	464	13,21-диметилгентриаконтан	$C_{33}H_{68}$	-	8.6±1.9	5.6±0.8
19	113.77	3170	420/421	450	3-метилгентриаконтан	$C_{32}H_{66}$	-	-	2.6±0.4
20	115.45	3226	182/183, 308/309	464	12-метилдотриаконтан	$C_{33}H_{68}$	-	-	6.5±0.7
	115.54	3229	154/155, 336/337	464	10-метилдотриаконтан	$C_{33}H_{68}$			
21	116.41	3259	420/421	464	4-метилдотриаконтан	$C_{33}H_{68}$	-	-	7.4±0.2
22	117.23	3287	252/253	478	2,16-диметилдотриаконтан	$C_{34}H_{70}$	-	-	18.8±1.0
	117.37	3293	168/169, 336/337	478	2,10-диметилдотриаконтан	$C_{34}H_{70}$			
23	118.09	3320	168/169, 252/253, 266/267, 350/351	492	2,10,16- и/или 2,10,22-триметилдотриаконтан	$C_{35}H_{72}$	-	-	13.8±1.1
24	118.34	3325	252/253	478	17-метилтриаконтан	$C_{34}H_{70}$			
	118.38	3326	196/197, 308/309	478	13-метилтриаконтан	$C_{34}H_{70}$	-	8.1±1.2	19.6±0.8
	118.46	3329	168/169, 336/337	478	11-метилтриаконтан	$C_{34}H_{70}$			

Приложение 3. Продолжение. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле личинок IV возраста, куколках и имаго колорадского жука. По 5 биологических повторностей в каждой фазе. Одна повторность = 80 насекомых для личинок и куколок, 40 насекомых для имаго

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	M+	Структура	Брутто-формула	Содержание, мкг/мг экстракта		
							Личинки	Куколки	Имаго
25	119.18	3355	168/169, 252/253, 266/267, 350/351	492	11,17-диметилтритриаконтан	$C_{35}H_{72}$	-	11.4±2.3	23.6±1.5
	119.28	3358	168/169, 196/197, 322/323, 350/351	492	11,21-диметилтритриаконтан	$C_{35}H_{72}$			
26	121.16	3424	252/253, 266/267	492	17-метилтетратриаконтан	$C_{35}H_{72}$	-	-	3.6±0.3
27	121.91	3451	182/183, 252/253, 280/281, 350/351	506	12,18-диметилтетратриаконтан	$C_{36}H_{74}$	-	-	6.6±0.9
	122.04	3456	154/155, 252/253, 280/281, 378/379	506	10,18-диметилтетратриаконтан	$C_{36}H_{74}$			
28	122.89	3486	252/253, 280/281	506	2,16-диметилтетратриаконтан	$C_{36}H_{74}$	-	-	8.6±1.2
	123.02	3491	168/169, 364/365	506	2,10-диметилтетратриаконтан	$C_{36}H_{74}$			
29	123.78	3519	168/169, 266/267, 280/281, 378/379	520	2,10,16-триметилтетратриаконтан	$C_{37}H_{76}$	-	-	44.3±4.2
	123.79	3519	168/169, 252/253, 294/295, 378/379		2,10,18-триметилтетратриаконтан	$C_{37}H_{76}$			
	123.91	3524	252/253, 280/281	506	17-метилпентатриаконтан	$C_{36}H_{74}$			
30	124.80	3557	168/169, 196/197, 252/253, 294/295, 350/351, 378/379	520	11,19-, 11,23-, 13,19- и/или 13,23-диметилпентатриаконтан	$C_{37}H_{76}$	-	-	35.1±4.2

Приложение 3. Продолжение. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле личинок IV возраста, куколок и имаго колорадского жука. По 5 биологических повторностей в каждой фазе. Одна повторность = 80 насекомых для личинок и куколок, 40 насекомых для имаго

№	Время удержания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	M+	Структура	Брутто-формула	Содержание, мкг/мг экстракта		
							Личинки	Куколки	Имаго
31	127.32	3651	182/183, 252/253, 308/309, 378/379	520 (M-15)	12,16- и/или 12,20-диметилгексатриаконтан	$C_{38}H_{78}$	-	-	2.5±0.4
	127.40	3654	154/155, 280/281, 406/407	520 (M-15)	10,18-диметилгексатриаконтан	$C_{38}H_{78}$			
32	129.92	3751	196/197, 224/225, 350/351, 378/379	535 (M-15)	13,23-диметилгептатриаконтан	$C_{39}H_{80}$	-	-	3.3±0.7
	129.94	3752	196/197, 378/379	535 (M-15)	13,25-диметилгептатриаконтан	$C_{39}H_{80}$			
33	130.49	3773	196/197, 266/267, 322/323, 392/393	549 (M-15)	13,17,25-триметилгептатриаконтан	$C_{40}H_{82}$	-	-	1.5±0.4
Сумма:							856.7±35.5	829.8±60.4	729±20.5

*предположительная структура

Приложение 4. Идентифицированные углеводороды в экстрактах целого тела живых (контроль) и колонизированных грибом *M. robertsii* личинок колорадского жука (4 биологических повторности, по 40 особей в каждой)

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	M+	Структура	Брутто-формула	Содержание, мкг/мг экстракта	
							Живые личинки	Личинки, колонизированные грибом
1	98.47	2696	112/113, 308/309	394	2,6-диметилгексакозан	C ₂₈ H ₅₈	6.1±0.5	0.71±0.26
2	101.70	2789	168/169, 266/267	408	11-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	1.45±0.09	0.30±0.14
3	101.92	2797	112/113, 322/323	408	7-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	4.0±0.3	0.9±0.4
4	103.02	2830	154/155, 280/281	408	10-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	5.5±0.6	-
5	104.00	2860	365, 393 (M-15)	408	4- и/или 2-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	43.4±4.7	2.7±2.2
6	105.11	2894	168/169, 280/281	422	2,10- и/или 2,18-диметилоктакозан	C ₃₀ H ₆₂	81.2±8.5	2.6±1.2
7	105.36	2903	112/113, 336/337	422	2,6-диметилоктакозан	C ₃₀ H ₆₂	118.9±14.2	7.5±3.9
8	105.98	2922	168/169, 196/197, 266/267, 294/295	436	2,10,16-триметилоктакозан	C ₃₁ H ₆₄	15.5±1.4	1.9±0.7
	106.06	2924	168/169, 294/295	436	2,10,18-триметилоктакозан	C ₃₁ H ₆₄		
9	106.31	2931	168/169, 280/281	422	11-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	36.2±4.4	2.2±0.5
10	107.28	2961	168/169, 294/295	436	11,19-диметилнонакозан	C ₃₁ H ₆₄	5.8±0.3	-
11	108.50	2994	112/113, 350/351	436	2,23-диметилнонакозан*	C ₃₁ H ₆₄	3.3±0.2	0.6±0.3
12	109.46	3029	182/183, 280/281	436	12-метилтриаконтан	C ₃₁ H ₆₄	5.5±0.6	0.4±0.1
13	110.44	3062	393, 421 (M-15)	436	4- и/или 2-метилтриаконтан	C ₃₁ H ₆₄	6.0±0.6	1.8±1.2
14	111.38	3090	196/197, 280/281	450	2,12- и/или 2,18-диметилтриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	15.9±1.6	-
15	111.61	3100	112/113, 364/365	450	2,6-диметилтриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	12.6±1.7	-
16	112.52	3128	196/197, 280/281	450	13-метилгептриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	4.4±0.9	1.2±0.2
Сумма:							365.8±39.6	23.1±10.8

* Предположительная структура

Приложение 5. Идентифицированные свободные жирные кислоты в экстрактах целого личинок колорадского жука до и после колонизации грибом *M. robertsii* (4 биологических повторности, по 40 особей в каждой)

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	M+, m/z	Название	Структура	Содержание, мкг/ мг экстракта	
						Контроль	<i>M. robertsii</i>
1	45.50	1526	214	Додекановая кислота	C12:0	0.68±0.13	0.077±0.034
2	56.59	1726	242	Тетрадекановая кислота	C14:0	1.09±0.23	0.15±0.03
3	59.88	1809	270	13-метилтетрадекановая кислота	изоC15:0	0.90±0.18	-
4	61.74	1827	256	Пентадекановая кислота	C15:0	0.31±0.05	0.15±0.02
5	64.95	1891	266	7,10-Гексадекадиеновая кислота	C16:2	0.86±0.07	0.10±0.02
6	65.24	1899	264	7,10,13-Гексадекатриеновая кислота	C16:3	4.6±1.2	-
7	65.57	1904	268	9-Гексадекеновая кислота	C16:1	1.13±0.17	0.12±0.02
8	66.75	1929	270	Пальмитиновая кислота	C16:0	19.4±3.4	6.8±1.2
9	69.64	1998	284	15-метилгексадекановая кислота	изоC17:0	0.20±0.03	0.08±0.02
10	70.61	2011	282	cis-10-гептадекеновая кислота	C17:1	0.41±0.08	0.09±0.02
11	71.38	2028	284	Гептадекановая кислота	C17:0	0.74±0.13	0.50±0.10
12	74.46	2097	294	Линолевая кислота	C18:2	26.3±1.7	12.3±3.5
13	74.73	2103	292	Линоленовая кислота	C18:3	33.1±5.1	2.8±0.9
14	74.84	2106	296	Олеиновая кислота	C18:1	34.6±7.0	10.8±2.8
15	75.95	2131	298	Стеариновая кислота	C18:0	12.6±2.1	2.5±0.5
16	80.22	2229	312	Нонадекановая кислота	C19:0	0.40±0.07	0.045±0.008
17	83.25	2302	320	11,14,17-Эйкозатриеновая кислота	C20:3	0.50±0.16	0.034±0.006
18	84.38	2329	326	Эйкозановая кислота	C20:0	1.7±0.3	0.18±0.04
Сумма:						139.7±9.6	36.8±9.1

Приложение 6. Идентифицированные связанные жирные кислоты в экстрактах здоровых и колонизированных *M. robertsii* личинках колорадского жука (4 биологических повторности, по 40 особей в каждой)

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	M+, m/z	Название	Структура	Содержание, мкг/ мг экстракта	
						Контроль	<i>M. robertsii</i>
1	56.59	1726	242	Тетрадекановая кислота	C14:0	3.01±0.24	0.85±0.58
2	61.74	1827	256	Пентадекановая кислота	C15:0	1.03±0.07	1.66±0.71
3	64.95	1891	266	7,10-Гексадекадиеновая кислота	C16:2	1.30±0.24	1.38±0.39
4	65.34	1899	264	7,10,13-Гексадекатриеновая кислота	C16:3	11.2±0.5	1.89±0.64
5	65.57	1904	268	9-Гексадекеновая кислота	C16:1	2.61±0.12	1.70±0.44
6	66.75	1929	270	Пальмитиновая кислота	C16:0	78.7±3.7	111.1±28.1
7	70.17	1998	284	15-метилгексадекановая кислота	изоC17:0		2.46±1.40
8	70.61	2011	282	cis-10-гептадекеновая кислота	C17:1		1.33±0.51
9	71.38	2028	284	Гептадекановая кислота	C17:0	3.11±0.11	8.40±2.12
10	74.46	2097	294	Линолевая кислота	C18:2	103.5±3.8	195.9±41.5
11	74.73	2103	292	Линоленовая кислота	C18:3	135.2±7.3	46.2±14.1
12	74.84	2106	296	Олеиновая кислота	C18:1	89.0±4.0	187.4±47.1
13	75.95	2131	298	Стеариновая кислота	C18:0	51.4±2.6	41.8±12.5
14	80.22	2229	312	Нонадекановая кислота	C19:0	1.43±0.03	0.76±0.26
15	84.38	2329	326	Эйкозановая кислота	C20:0	4.75±0.20	2.17±1.07
Сумма:						486.3±17.3	605.1±68.2

Приложение 7. Идентифицированные свободные и связанные жирные кислоты в экстрактах конидий *M. robertsii*, выращенных на личинках колорадского жука (5 биологических повторностей для свободных кислот, 4 – для связанных, одна повторность = 0.2 г конидий)

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	M+, m/z	Название	Структура	Содержание, мкг/ мг экстракта
Свободные кислоты						
1	45.50		214	Додекановая кислота	C12:0	0.20±0.06
2	56.56	1726	242	Тетрадекановая кислота	C14:0	0.66±0.18
3	61.74	1827	256	Пентадекановая кислота	C15:0	0.36±0.09
5	64.85	1891	270	14-метилпентадекановая кислота	изоC16:0	0.091±0.014
6	65.57	1904	268	9-Гексадекеновая кислота	C16:1	0.22±0.06
9	66.75	1929	270	Пальмитиновая кислота	C16:0	8.4±1.0
10	71.38	2028	284	Гептадекановая кислота	C17:0	0.35±0.05
12	74.46	2097	294	Линолевая кислота	C18:2	10.8±4.1
13	74.84	2106	296	Олеиновая кислота	C18:1	9.0±1.1
15	75.95	2131	298	Стеариновая кислота	C18:0	3.3±0.2
16	84.38	2329	326	Эйкозановая кислота	C20:0	0.50±0.10
17	92.20	2531	354	Докозановая кислота	C22:0	0.10±0.02
18	99.48	2732	382	Тетракозановая кислота	C24:0	0.12±0.03
Сумма:						35.4±6.3
Связанные кислоты						
1	56.59	1727	242	Тетрадекановая кислота	C14:0	0.96±0.31
2	65.57	1904	268	9-Гексадекеновая кислота	C16:1	0.99±0.26
3	66.75	1929	270	Пальмитиновая кислота	C16:0	27.3±7.1
4	71.38	2029	284	Гептадекановая кислота	C17:0	1.3±0.4
5	74.46	2098	294	Линолевая кислота	C18:2	44.4±8.0
6	74.97	2110	296	Олеиновая кислота	C18:1	45.6±11.6
7	75.95	2132	298	Стеариновая кислота	C18:0	10.0±2.0
8	84.38	2330	326	Эйкозановая кислота	C20:0	0.93±0.23
Сумма:						136.0±30.2

Приложение 8. Идентифицированные углеводороды в экстрактах личинок шкурок личинок колорадского жука после развития на них гриба *M. robertsii* и в контрольном варианте (обработка водой), 4 биологических повторности, по 80 шкурок в каждой

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	M+, m/z	Структура	Брутто-формула	Содержание, мкг	
							контроль	<i>M. robertsii</i>
1	98.44	2698	112/113, 308/309	394	2,6-диметилгексакозан	$C_{28}H_{58}$	19.7±1.8	13.2±1.1
2	99.47	2728	196/197, 224/225	394	13-метилгептакозан	$C_{28}H_{58}$	12.9±2.1	6.9±1.4
3	101.90	2799	112/113, 322/323	408	7-метилоктакозан	$C_{29}H_{60}$	19.0±2.3	14.5±3.3
4	102.98	2831	154/155, 280/281	408	10-метилоктакозан	$C_{29}H_{60}$	13.5±1.7	4.2±1.2
5	104.03	2863	364/365, 392/393	408	4- и/или 2-метилоктакозан	$C_{29}H_{60}$	568±32	449±32
6	105.15	2896	168/169, 280/281	422	2,10- и/или 2,18-диметилоктакозан	$C_{30}H_{62}$	523±57	112±27
7	105.42	2905	112/113, 336/337	422	2,6-диметилоктакозан	$C_{30}H_{62}$	1334±98	667±100
8	106.03	2924	168/169, 196/197, 266/267, 294/295	436	2,10,16-триметилоктакозан	$C_{31}H_{64}$	416±34	161±36
	106.13	2927	168/169, 294/295	436	2,10,18-триметилоктакозан	$C_{31}H_{64}$		
9	106.29	2932	168/169, 280/281	422	11-метилнонакозан	$C_{30}H_{62}$	379±24	135±32
10	107.21	2961	168/169, 196/197, 266/267, 294/295	436	11,17*-диметилнонакозан	$C_{31}H_{64}$	153±6	50.0±14.1
	107.26	2962	168/169, 294/295	436	11,19-диметилнонакозан	$C_{31}H_{64}$		
11	109.41	3030	182/183, 280/281	436	12-метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$	17.9±2.6	4.6±1.3
12	110.47	3064	392/393, 420/421	436	4- и/или 2-метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$	315±15	288±36
13	111.37	3093	196/197, 280/281	450	2,12- и/или 2,18-диметилтриаконтан	$C_{32}H_{66}$	106±6	28.7±8.8
14	111.61	3101	112/113, 364/365	450	2,6-диметилтриаконтан	$C_{32}H_{66}$	148±9	84.8±17.0

Приложение 8. Продолжение. Идентифицированные углеводороды в экстрактах личинок шкурок личинок колорадского жука после развития на них гриба *M. robertsii* и в контрольном варианте (обработка водой), 4 биологических повторности, по 80 шкурок в каждой

Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	M+, m/z	Структура	Брутто-формула	Содержание, мкг	
						контроль	<i>M. robertsii</i>
112.08	3116	196/197, 224/225, 266/267, 294/295	464	13,17- диметилгентриаконтан	$C_{33}H_{68}$	72.0±4.6	26.8±11.0
112.21	3120	168/169, 224/225, 266/267, 322/323	464	11,17- диметилгентриаконтан	$C_{33}H_{68}$		
112.47	3129	196/197, 280/281	450	13- метилгентриаконтан	$C_{32}H_{66}$	69.1±4.4	20.2±8.5
Сумма:						4169±266	2067±314

*Предположительная структура

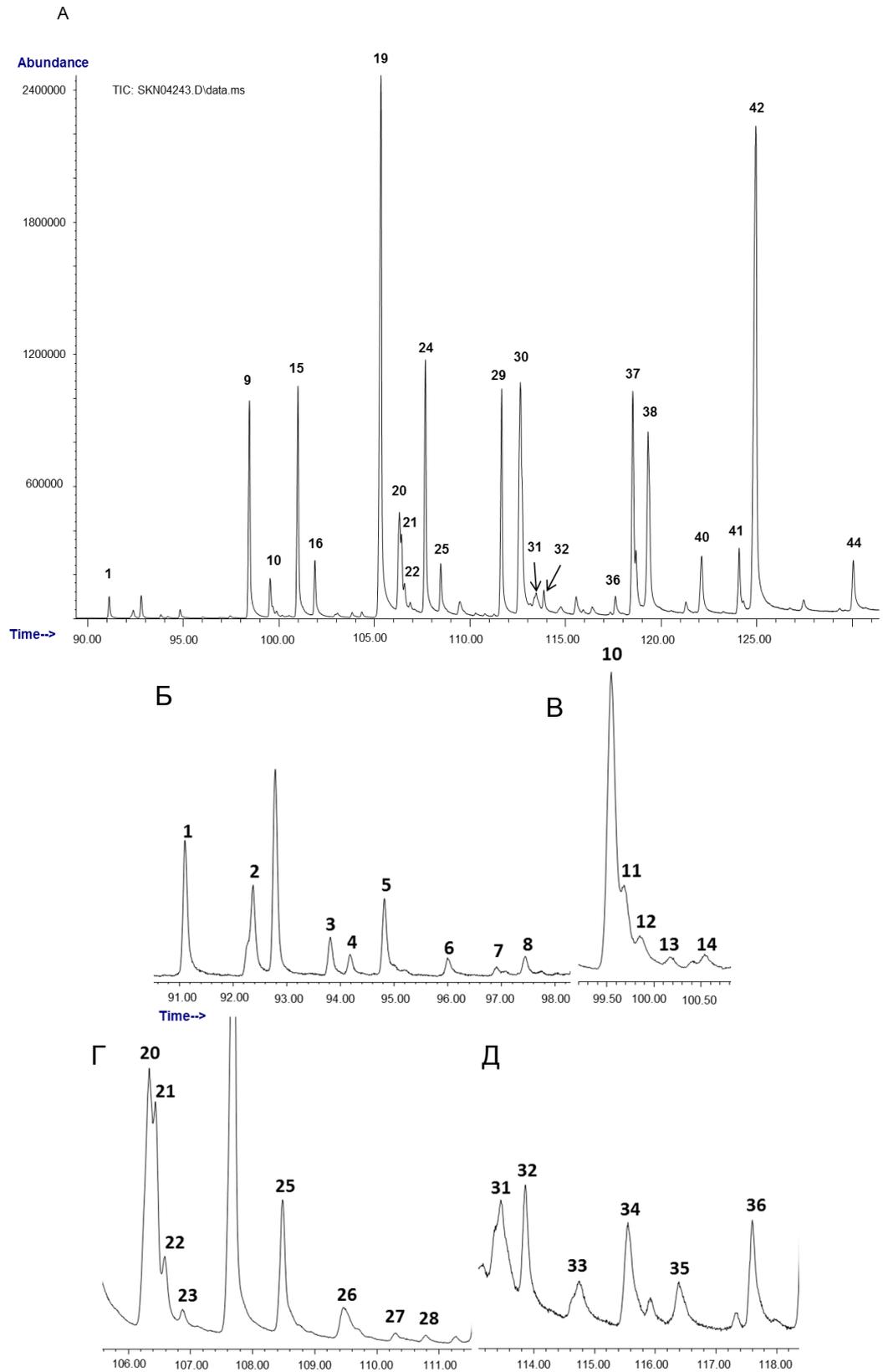
Приложение 9. Идентифицированные свободные жирные кислоты в экстрактах личинок шкурки личинок колорадского жука после развития на них грибов *M. robertsii* (4 биологических повторности, по 80 шкурки в каждой)

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	M+, m/z	Название	Структура	Содержание в экстракте, мкг	
						Контроль	<i>M. robertsii</i>
1	56.76	1726	242	Тетрадекановая кислота	C14:0	0.70±0.30	0.96±0.48
2	60.17	1792	270	13-метилтетрадекановая кислота	изоC15:0	0.12±0.04	0.11±0.05
3	61.94	1828	256	Пентадекановая кислота	C15:0	0.67±0.17	0.68±0.22
6	64.79	1885	270	14-метилпентадекановая кислота	изоC16:0	0.075±0.018	0.088±0.031
5	65.49	1899	268	9-Гексадекановая кислота	C16:1	0.11±0.03	0.12±0.02
6	66.85	1928	270	Пальмитиновая кислота	C16:0	8.0±3.0	9.8±0.9
7	70.54	2007	282	cis-10-гептадекановая кислота	C17:1	0.061±0.018	0.053±0.018
8	71.30	2024	284	Гептадекановая кислота	C17:0	0.24±0.06	0.32±0.07
9	74.44	2095	294	Линолевая кислота	C18:2	0.86±0.43	1.52±0.31
10	74.50	2096	292	Линоленовая кислота	C18:3	0.19±0.10	0.28±0.07
11	74.74	2102	296	Олеиновая кислота	C18:1	2.20±1.02	3.41±0.42
12	76.00	2130	298	Стеариновая кислота	C18:0	3.92±1.77	4.84±0.57
13	80.15	2225	312	Нонадекановая кислота	C19:0	0.099±0.004	0.17±0.04
14	84.44	2329	326	Эйкозановая кислота	C20:0	0.32±0.13	0.40±0.05
15	92.15	2528	354	Докозановая кислота	C22:0	0.20±0.06	0.22±0.03
16	99.43	2730	382	Тетракозановая кислота	C24:0	0.20±0.04	0.28±0.02
Сумма:						17.9±7.1	23.3±2.3

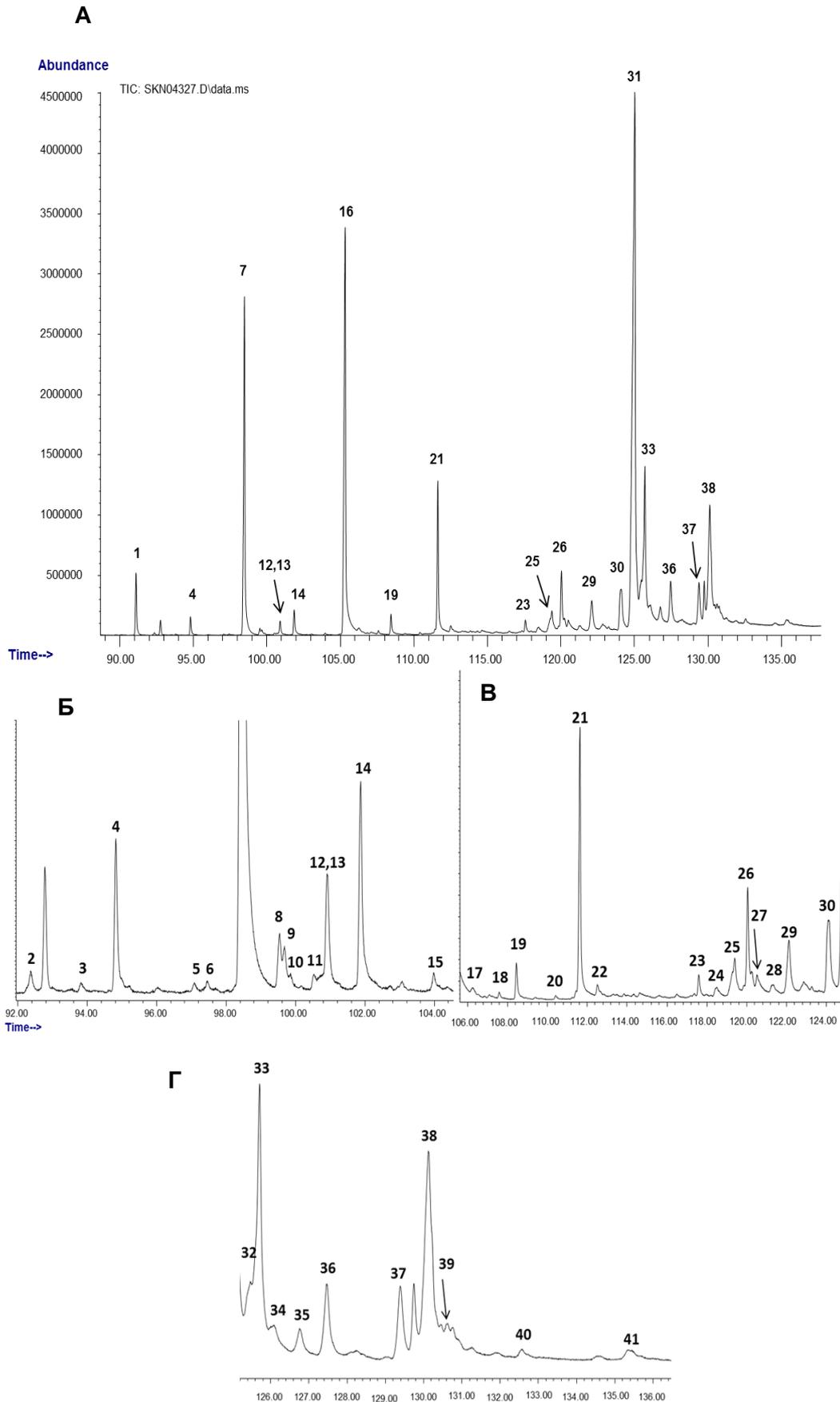
Приложение 10. Идентифицированные связанные жирные кислоты в экстрактах личинок шкурки личинок колорадского жука после развития на них гриба *M. robertsii* и в контрольном варианте (обработка водой), 4 биологических повторности, по 80 шкурки в каждой

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	M+, m/z	Название	Структура	Содержание, мкг/ мг экстракта	
						Контроль	<i>M. robertsii</i>
1	56.79	1726	242	Тетрадекановая кислота	C14:0	0.52±0.06	0.32±0.06
2	61.92	1827	256	Пентадекановая кислота	C15:0	0.87±0.10	0.27±0.04
3	66.83	1927	270	Пальмитиновая кислота	C16:0	2.35±0.23	2.70±0.48
4	74.47	2095	294	Линолевая кислота	C18:2	1.34±0.13	0.83±0.27
5	74.65	2099	292	Линоленовая кислота	C18:3	0.10±0.01	0.08±0.02
6	74.69	2100	296	Олеиновая кислота	C18:1	1.29±0.12	1.16±0.30
7	76.00	2130	298	Стеариновая кислота	C18:0	1.97±0.25	1.57±0.38
8	84.47	2330	326	Эйкозановая кислота	C20:0	0.067±0.013	0.31±0.12
Сумма:						8.53±0.84	7.23±1.61

Приложение 11. Хроматограмма углеводородного профиля *L. migratoria* (А) и фрагменты хроматограммы в области времен удерживания 90.5–98 мин (Б), 99–100.5 мин (В) 106–111 мин (Г) и 113.5–118 мин (Д). Номера пиков соответствуют таблице в Приложении 13.



Приложение 12. Хроматограмма углеводородного профиля *C. italicus* (А) и фрагменты хроматограммы в области времен удерживания 92–104 мин (Б), 106–124 мин (В) и 126–136 мин (Г). Номера пиков соответствуют таблице в Приложении 14.



Приложение 13. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле нимф III возраста *L. migratoria*, 6 биологических повторностей, по 80 особей в каждой

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	M+, m/z	Структура	Брутто-формула	мкг / г насекомого	
							мкг / мг экстракта	
1	91.109	2500	-	352	<i>n</i> -пентакозан	C ₂₅ H ₅₂	2.05±0.24	3.4±0.4
2	92.37	2527	196/197	351 (M-15)	13-метил пентакозан	C ₂₆ H ₅₄	сл	
3	93.81	2566	336/337	351 (M-15)	3-метил пентакозан	C ₂₆ H ₅₄	сл	
4	94.19	2576	84/85, 196/197, 210/211, 322/323	365 (M-15)	5,13-диметил пентакозан	C ₂₇ H ₅₆	сл	
5	94.83	2600	-	366	<i>n</i> -гексакозан	C ₂₆ H ₅₄	сл	
6	96.01	2626	196/197, 210/211	365 (M-15)	13-метилгексакозан	C ₂₇ H ₅₆	сл	
7	96.90	2651	70/71, 336/337	365 (M-15)	4-метилгексакозан	C ₂₇ H ₅₆	сл	
8	97.44	2667	350/351	365 (M-15)	3-метилгексакозан	C ₂₇ H ₅₆	сл	
9	98.45	2700	-	380	<i>n</i> -гептакозан	C ₂₇ H ₅₆	24.9±2.5	40.9±3.8
10	99.54	2726	196/197, 224/225	394, 379 (M-15)	13-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	3.56±0.38	5.8±0.6
	99.55	2727	168/169, 252/253	394, 379 (M-15)	11-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈		
11	99.66	2730	140/141, 280/281	394, 379 (M-15)	9-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	сл	
12	99.87	2736	112/113, 308/309	394, 379 (M-15)	7-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	сл	
13	100.15	2744	84/85, 336/337	394, 379 (M-15)	5-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	сл	
14	100.53	2756	168/169, 196/197, 238/239, 266/267	393 (M-15)	11,15-диметилгептакозан *	C ₂₉ H ₆₀	сл	
15	100.98	2769	364/365	394	3-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	24.3±2.4	40.0±3.8
16	101.88	2800	-	394	<i>n</i> -октакозан	C ₂₈ H ₅₈	6.82±0.68	11.2±1.1
17	103.82	2853	70/71, 364/365	393 (M-15)	4-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	сл	
18	104.34	2869	378/379	393 (M-15)	3-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	сл	
19	105.35	2900	-	408	<i>n</i> -нонакозан	C ₂₉ H ₆₀	82.6±6.4	135.8±9.5
20	106.27	2928	196/197, 252/253	422	13-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	12.9±1.0	21.3±1.5
	106.31	2930	168/169, 280/281	422	11-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂		
21	106.41	2933	140/141, 308/309	422	9-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	6.82±0.73	11.2±1.1
22	106.57	2938	112/113, 336/337	422	7-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	3.33±0.40	5.5±0.6
23	106.88	2947	84/85, 364/365	407 (M-15)	5-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	сл	
24	107.67	2975	392/393	422	3-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	29.3±2.4	48.3±3.8
25	108.47	3000	-	422	<i>n</i> -триаконтан	C ₃₀ H ₆₂	7.08±0.56	11.6±0.9

Приложение 13. Продолжение. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле нимф III возраста *L. migratoria*, 6 биологических повторностей, по 80 особей в каждой

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	M^+ , m/z	Структура	Брутто-формула	мкг / г насекомого		мкг / мг экстракта
26	109.45	3028	182/183, 280/281; 196/197, 266/267	422 (M-15)	13- и 12-метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$	сл		
	109.50	3030	168/169, 294/295	422 (M-15)	11-метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$	сл		
	109.54	3031	154/155, 308/309	422 (M-15)	10-метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$	сл		
		3033	140/141, 322/323	422 (M-15)	9-метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$	сл		
27	110.30	3056	70/71, 392/393	421 (M-15)	4-метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$	сл		
28	110.79	3072	406/407	407 (M-29)	3-метилтриаконтан	$C_{31}H_{64}$	сл		
29	111.66	3100	-	436	<i>n</i> -гептриаконтан	$C_{31}H_{64}$	28.5±2.1	46.8±3.2	
30	112.60	3131	196/197, 280/281	450	13-метилгептриаконтан	$C_{32}H_{66}$	48.8±4.3		80.2±6.6
	112.66	3133	168/169, 308/309	450	11-метилгептриаконтан	$C_{32}H_{66}$			
	112.74	3135	140/141, 336/337	450	9-метилгептриаконтан	$C_{32}H_{66}$			
31	113.47	3160	196/197, 294/295	450 (M-15)	13,19-диметилгептриаконтан*	$C_{33}H_{68}$	5.58±0.58		9.2±0.9
	113.48	3160	168/169, 196/197, 294/295, 322/323	450 (M-15)	11,19-диметилгептриаконтан	$C_{33}H_{68}$			
32	113.87	3173	420/421	450	3-метилгептриаконтан	$C_{32}H_{66}$	3.21±0.42	5.3±0.7	
33	114.66	3200	-	450	<i>n</i> -дотриаконтан	$C_{32}H_{66}$	сл		
34	115.53	3229	210/211, 280/281	449 (M-15)	14-метилдотриаконтан	$C_{33}H_{68}$	сл		
	115.55	3229	182/183, 308/309 196/197, 294/295	449 (M-15)	12- и 13-метилдотриаконтан	$C_{33}H_{68}$	сл		
							сл		
115.58	3230	168/169, 322/323	449 (M-15)	11-метилдотриаконтан	$C_{33}H_{68}$	сл			
35	116.39	3258	182/183, 196/197, 308/309, 322/323	463 (M-15)	12,20-диметилдотриаконтан	$C_{34}H_{70}$	сл		
36	117.61	3300	-	464	<i>n</i> -тритриаконтан	$C_{33}H_{68}$	2.61±0.29	4.3±0.5	
37	118.52	3331	196/197,308/309	478	13-метилтритриаконтан	$C_{34}H_{70}$	26.1±2.3		43.1±3.8
	118.54	3332	168/169, 336/337	478	11-метилтритриаконтан	$C_{34}H_{70}$			

Приложение 13. Продолжение. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле нимф III возраста *L. migratoria*, 6 биологических повторностей, по 80 особей в каждой

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	$M+$, m/z	Структура	Брутто-формула	мкг / г насекомого	мкг / мг экстракта
38	119.31	3359	196/197, 322/323	492	13,21-диметилтриакоктан	$C_{35}H_{72}$	33.7±3.4	55.3±5.4
	119.39	3361	168/169, 350/351	492	11,23-диметилтриакоктан*	$C_{35}H_{72}$		
39	121.29	3429	196/197, 322/323, 210/211, 308/309, 182/182, 336/337	477 (M-15)	12-, 13- и 14-метилтетраакоктан	$C_{35}H_{72}$	сл	
40	122.12	3459	182/193, 196/197, 336/337, 350/351	491 (M-15)	12,22-диметилтетраакоктан*	$C_{36}H_{74}$	9.70±0.87	16.0±1.4
41	124.08	3530	196/197, 336/337; 224/225, 308/309	505	13- и 15-метилпентаакоктан	$C_{36}H_{74}$	7.59±0.69	12.5±1.1
42	124.90	3560	196/197, 224/225, 322/323, 350/351	520	13,21-диметилпентаакоктан	$C_{37}H_{76}$	99.9±8.1	164.3±12.4
	124.97	3563	196/197, 350/351	520	13,23-диметилпентаакоктан	$C_{37}H_{76}$		
43	127.45	3656	196/197, 211/210, 350/351, 364/365; 182/183, 224/225, 336/337, 350/351	519 (M-15)	13,23- и 12,22*-диметилгексаакоктан	$C_{38}H_{78}$	сл	
44	130.05	3756	196/197, 224/225, 350/351, 378/379	533 (M-15)	13,23-диметилгептаакоктан	$C_{39}H_{80}$	7.72±0.70	12.7±1.1
Сумма:							477.2±39.7	784.9±61.6

*предположительная структура, сл – следовые количества

Приложение 14. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле нимф III возраста *C. italicus*, 6 биологических повторностей, по 80 особей в каждой

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z *	M+, m/z	Структура	Брутто-формула	мкг / г насекомого	мкг / мг экстракта
1	91.11	2500	-	352	<i>n</i> -пентакозан	C ₂₅ H ₅₂	8.85±0.75	14.4±1.3
2	92.35	2527	196/197	351 (M-15)	13-метилпентакозан	C ₂₆ H ₅₄	сл	
3	93.81	2566	336/337	366	3-метилпентакозан	C ₂₆ H ₅₄	сл	
4	94.82	2600	-	366	<i>n</i> -гексакозан	C ₂₆ H ₅₄	2.43±0.26	4.0±0.5
5	97.07	2656	336/337	380	4-метилгексакозан	C ₂₇ H ₅₆	сл	
6	97.45	2667	350/351	380	3-метилгексакозан	C ₂₇ H ₅₆	сл	
7	98.48	2700	-	380	<i>n</i> -гептакозан	C ₂₇ H ₅₆	55.5±3.5	90.5±6.9
8	99.54	2726	196/197, 224/225; 168/169, 252/253	379 (M-15)	13- и 11-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	сл	
9	99.68	2731	140/141, 280/281	379 (M-15)	9-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	сл	
10	99.85	2736	112/113, 308/309	379 (M-15)	7-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	сл	
11	100.53	2755	168/169, 196/197, 238/239, 266/267	393 (M-15)	11,15-диметилгептакозан *	C ₂₉ H ₆₀	сл	
12	100.92	2767	112/113, 196/197, 238/239, 322/323	393 (M-15)	7,15-диметилгептакозан *	C ₂₉ H ₆₀	2.22±0.21	3.7±0.4
13	100.94	2767	364/365	394	3-метилгептакозан	C ₂₈ H ₅₈	0.55±0.07	0.9±0.1
14	101.87	2800	-	394	<i>n</i> -октакозан	C ₂₈ H ₅₈	4.03±0.42	6.6±0.8
15	103.97	2858	364/365	408	4-метилоктакозан	C ₂₉ H ₆₀	сл	
16	105.33	2900	-	408	<i>n</i> -нонакозан	C ₂₉ H ₆₀	82.7±5.4	134.9±10.2
17	106.23	2927	197/196, 252/253, 224/225	407 (M-15)	13- и 15-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	сл	
	106.28	2928	168/169, 280/281	407 (M-15)	11-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	сл	
18	107.59	2970	392/393	407 (M-15)	3-метилнонакозан	C ₃₀ H ₆₂	сл	
19	108.46	3000	-	422	<i>n</i> -триаконтан	C ₃₀ H ₆₂	3.45±0.33	5.6±0.6
20	110.42	3060	392/393	421 (M-15)	4-метилтриаконтан	C ₃₁ H ₆₄	сл	
21	111.63	3100	-	436	<i>n</i> -гентриаконтан	C ₃₁ H ₆₄	23.9±1.8	39.1±3.6
22	112.51	3128	168/169, 196/197, 280/281, 308/309	435 (M-15)	13- и 11-метилгентриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	сл	
	112.69	3134	140/141, 336/337	435 (M-15)	9-метилгентриаконтан	C ₃₂ H ₆₆	сл	
23	117.59	3300	-	464	<i>n</i> -тритриаконтан	C ₃₃ H ₆₈	2.08±0.31	3.4±0.6
24	118.40	3327	196/197, 224/225, 280/281, 308/309	463 (M-15)	15- и 13-метилтритриаконтан	C ₃₄ H ₇₀	сл	
	118.52	3331	168/169, 336/337	463 (M-15)	11-метилтритриаконтан	C ₃₄ H ₇₀	сл	
	125.71	3590	112/113, 224/225, 266/267, 294/295, 336/337, 448/449	535	7,17,21-триметилпентатриаконтан*	C ₃₈ H ₇₈	сл	

Приложение 14. Продолжение. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле нимф III возраста *C. italicus*, 6 биологических повторностей, по 80 особей в каждой

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z *	M+, m/z	Структура	Брутто-формула	мкг / г насекомого	мкг / мг экстракта
25	119.17	3354	196/197, 224/225, 294/295, 322/323	477 (M-15)	13,19-диметилтриакоктан	$C_{35}H_{72}$	7.88±0.87	12.9±1.5
	119.29	3358	168/169, 224/225, 294/295, 350/351	477 (M-15)	11,19-диметилтриакоктан	$C_{35}H_{72}$		
	119.40	3362	140/141, 224/225, 294/295, 378/379	477 (M-15)	9,19-диметилтриакоктан	$C_{35}H_{72}$		
26	120.05	3384	140/141, 210/211, 224/225, 308/309, 322/323, 392/393	506	9,13,19*-триметилтриакоктан	$C_{36}H_{74}$	6.03±0.50	9.8±0.9
27	120.51	3402	84/85, 224/225, 238/239, 294/295, 308/309, 448/449	506	5,15,19-триметилтриакоктан *	$C_{36}H_{74}$	сл	
	120.61	3406	84/85, 182/183, 196/197, 336/337, 350/351, 448/449	506	5,11,21-триметилтриакоктан *	$C_{36}H_{74}$	сл	
28	121.39	3432	224/225, 238/239, 280/281, 294/295	492	15- и 16-метилтетра триакоктан	$C_{35}H_{72}$	сл	
	121.45	3435	182/183, 196/197, 322/323, 336/337	492	12- и 13-метилтетра триакоктан	$C_{35}H_{72}$	сл	
	121.51	3437	168/169, 350/351	492	11-метилтетра триакоктан	$C_{35}H_{72}$	сл	
29	122.10	3458	168/169, 238/239, 294/295, 364/365	491 (M-15)	11,15- диметилС тетра триакоктан *	$C_{36}H_{74}$	8.48±0.77	13.9±1.4
30	124.02	3528	252/253, 280/281	506	17-метилпента триакоктан	$C_{36}H_{74}$	13.4±1.5	21.9±2.8
	124.06	3529	224/225, 308/309	506	15-метилпента триакоктан	$C_{36}H_{74}$		
	124.09	3530	196/197, 336/337	506	13-метилпента триакоктан	$C_{36}H_{74}$		
	124.14	3532	168/169, 364/365	506	11-метилпента триакоктан	$C_{36}H_{74}$		
31	124.84	3558	196/197, 252/253, 294/295, 350/351	520	13,19-диметилпента триакоктан	$C_{37}H_{76}$	179.0±9.4	292.0±19.1
	124.92	3561	168/169, 252/253, 294/295, 378/379	520	11,19-диметилпента триакоктан	$C_{37}H_{76}$		
	125.01	3564	168/169, 378/379	520	11,25-диметилпента триакоктан*	$C_{37}H_{76}$		
	125.05	3566	168/169, 224/225, 322/323, 378/379	520	11,21-диметилпента триакоктан*	$C_{37}H_{76}$		

Приложение 14. Продолжение. Идентифицированные углеводороды в эпикутикуле нимф III возраста *C. italicus*, 6 биологических повторностей, по 80 особей в каждой

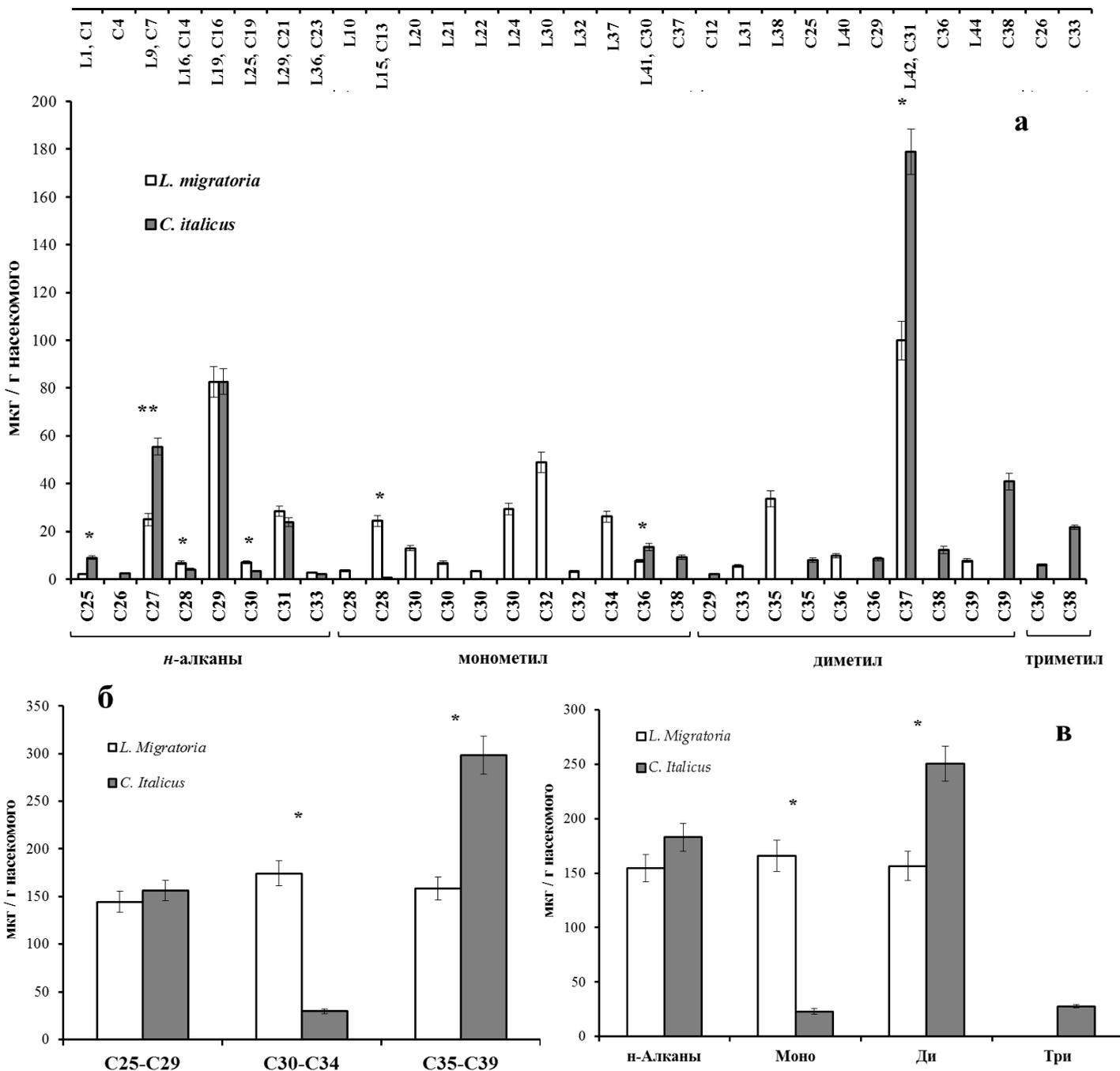
№	Время удерживания, мин	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z *	M+, m/z	Структура	Брутто-формула	мкг / г насекомого	
							мкг / мг экстракта	
32	125.48	3582	168/169, 196/197, 238/239, 322/323, 364/365, 392/393	520 (M-15)	11,15,23-триметилпентатриаконтан	$C_{38}H_{78}$	сл	
33	125.61	3587	140/141, 210/211, 252/253, 308/309, 350/351, 420/421	535	9,13,19-триметилпентатриаконтан*	$C_{38}H_{78}$	21.7±1.0	35.3±2.2
	125.71	3590	112/113, 224/225, 266/267, 294/295, 336/337, 448/449	535	7,17,21-триметилпентатриаконтан*	$C_{38}H_{78}$		
34	126.09	3605	84/85, 210/211, 224/225, 350/351, 336/337, 476/477	535	5,13,21-триметилпентатриаконтан*	$C_{38}H_{78}$	сл	
			84/85, 182/183, 224/225, 336/337, 378/379, 476/477	535	5,11,21-триметилпентатриаконтан*	$C_{38}H_{78}$	л	
			84/85, 154/155, 224/225, 336/337, 406/407, 476/477	535	5,9,21-триметилпентатриаконтан*	$C_{38}H_{78}$	сл	
35	126.77	3630	182/183, 196/197, 224/225, 322/323, 350/351, 364/365	520	12-,13- и 15-метилгексатриаконтан*	$C_{37}H_{76}$	сл	
36	127.46	3656	168/169, 182/183, 252/253, 266/267, 294/295, 308/309, 378/379, 392/393	534	12,20- и 11,19-диметилгексатриаконтан	$C_{38}H_{78}$	12.1±1.5	19.9±2.9
37	129.29	3727	252/253, 308/309	536	17-метилгептатриаконтан	$C_{38}H_{78}$	9.08±0.99	14.8±1.8
	129.40	3731	196/197, 364/365		13-метилгептатриаконтан			
	129.44	3733	168/169, 392/393		11-метилгептатриаконтан			
38	130.07	3757	196/197, 378/379	548	13,25-диметилгептатриаконтан	$C_{39}H_{80}$	40.9±3.5	66.9±6.8
	130.15	3760	168/169, 252/253, 322/323, 406/407	548	11,21-диметилгептатриаконтан*	$C_{39}H_{80}$		
39	130.62	3779	168/169, 238/239, 252/253, 336/337, 350/351, 420/421	549 (M-15)	11,15,21-триметилгептатриаконтан*	$C_{40}H_{82}$	сл	
40	132.57	3854	182/183, 252/253, 280/281, 308/309, 336/337, 406/407	549 (M-15)	12,20*- и 12,22*-диметилгептатриаконтан	$C_{40}H_{82}$	сл	
41	135.28	3950	168/169, 434/435	548 (M-29)	11,29-диметилнонатриаконтан*	$C_{41}H_{84}$	сл	
	135.39	3953	168/169, 196/197, 406/407, 434/435	549 (M-29)	11,27-диметилнонатриаконтан*	$C_{41}H_{84}$	сл	

135.45	3955	140/141, 462/463	549 (M-29)	9,31- диметилнонатриак онтан*	C ₄₁ H ₈₄	сл	
Сумма:						484.2±32.6	790.9±63.6

* предположительная структура, сл – следовые количества

Приложение 15. Содержание углеводов в эпикутикулярном экстракте нимф в пересчете на массу насекомого *C. italicus* и *L. migratoria*. а – распределение индивидуальных компонентов; б – распределение по количеству атомов углерода; в – распределение по количеству метильных групп; на верхней оси указаны номера соединений (*L* для *L. migratoria* и *C* для *C. italicus*), соответствующих таблицам в Приложениях 13 и 14, на нижней оси указано общее количество атомов углерода.

Использовано 6 повторностей по 80 особей в каждой. Значимые различия между видами: *тест Стьюдента, ** тест Манна-Уитни, $p < 0.05$. В случаях отсутствия компонента в одном из вариантов сравнения не проводили



Приложение 16. Жирные кислоты, идентифицированные в эпикутикуле *L. migratoria* (суммарное количество свободных и связанных кислот, 6 биологических повторностей, по 80 особей в каждой)

№	Время удерживания, мин	ЛИУ	M+ (m/z)	Структура	Название	мкг / мг экстракта	мкг / г насекомого
1	56.69	1726	242	C14:0	Тетрадекановая кислота	0.29±0.06	0.17 ±0.04
2	61.88	1827	256	C15:0	Пентадекановая кислота	0.09 ±0.02	0.06 ±0.01
3	66.75	1927	270	C16:0	Гексадекановая кислота	2.59 ±0.35	1.56 ±0.21
4	71.46	2025	284	C17:0	Гептадекановая кислота	0.07 ±0.01	0.04 ±0.01
5	74.41	2091	294	C18:2	Линолевая кислота	0.81 ±0.19	0.49 ±0.11
6	74.71	2097	292	C18:3	Линоленовая кислота	2.95 ±0.57	1.78 ±0.34
7	74.72	2099	296	C18:1	Олеиновая кислота	1.33 ±0.19	0.80 ±0.11
8	75.97	2127	298	C18:0	Стеариновая кислота	1.21 ±0.16	0.73 ±0.09
9	84.43	2325	326	C20:0	Эйкозановая кислота	0.37 ±0.06	0.22 ±0.03
10	92.26	2524	354	C22:0	Докозановая кислота	0.25 ±0.04	0.15 ±0.02
11	99.53	2726	382	C24:0	Тетракозановая кислота	0.24 ±0.04	0.14 ±0.02
12	106.35	2931	410	C26:0	Гексакозановая кислота	1.02 ±0.14	0.62 ±0.09
13	112.71	3134	438	C28:0	Октакозановая кислота	4.09 ±0.71	2.48 ±0.43
14	118.67	3336	466	C30:0	Трикозановая кислота	5.08 ±0.95	3.08 ±0.57
15	124.31	3539	494	C32:0	Дотрикозановая кислота	0.73 ±0.13	0.44 ±0.08
16	129.63	3740	522	C34:0	Тетратрикозановая кислота	0.11 ±0.01	0.07 ±0.01
Сумма:						21.1±2.5	12.8±1.5

Приложение 17. Жирные кислоты, идентифицированные в эпикутикуле *C. italicus* (суммарное количество свободных и связанных кислот, 6 биологических повторностей, по 80 особей в каждой)

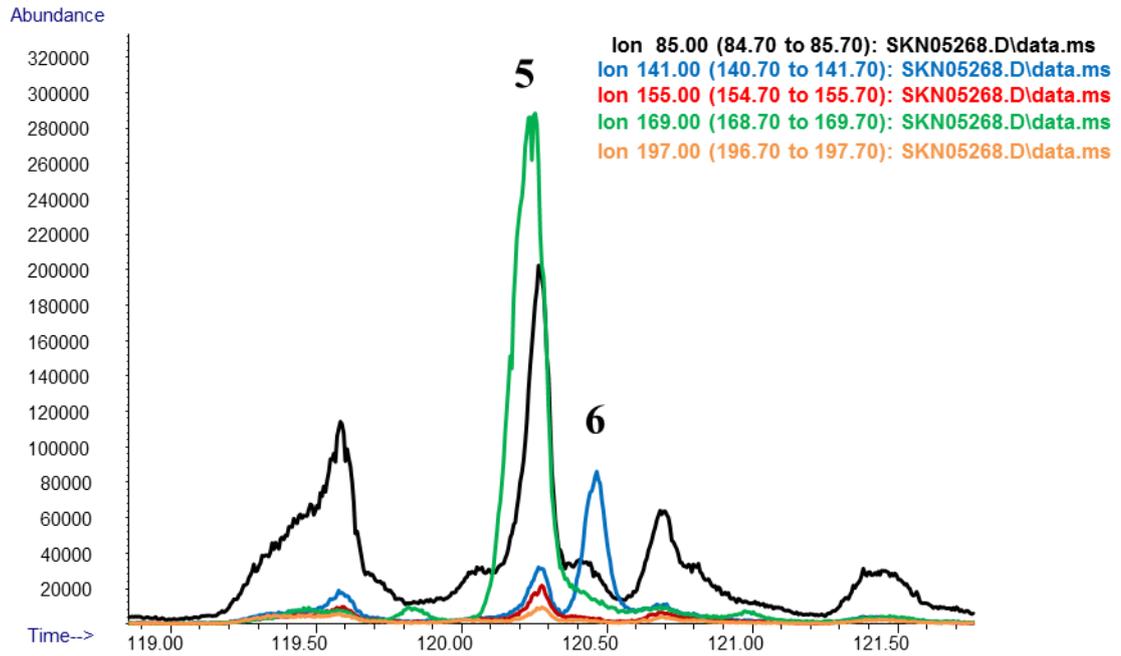
№	Время удерживания, мин	ЛИУ	M+ (m/z)	Структура	Название	мкг / мг экстракта	мкг / г насекомого
1	66.75	1927	270	C16:0	Гексадекановая кислота	4.8±0.5	2.9 ±0.3
2	74.42	2091	294	C18:2	Линолевая кислота	1.6 ±0.2	0.98 ±0.16
3	74.69	2097	292	C18:3	Линоленовая кислота	2.1± 0.4	1.31 ±0.23
4	74.71	2099	296	C18:1	Олеиновая кислота	2.8 ±0.3	1.74 ±0.17
5	75.96	2127	298	C18:0	Стеариновая кислота	2.4 ±0.3	1.45 ±0.17
6	84.42	2325	326	C20:0	Эйкозановая кислота	0.36 ±0.06	0.22 ±0.04
Сумма:						14.1±1.7	8.6±0.9

Приложение 18. Идентифицированные кетоны в эпикутикуле *C. italicus* (6 биологических повторностей, по 80 особей в каждой)

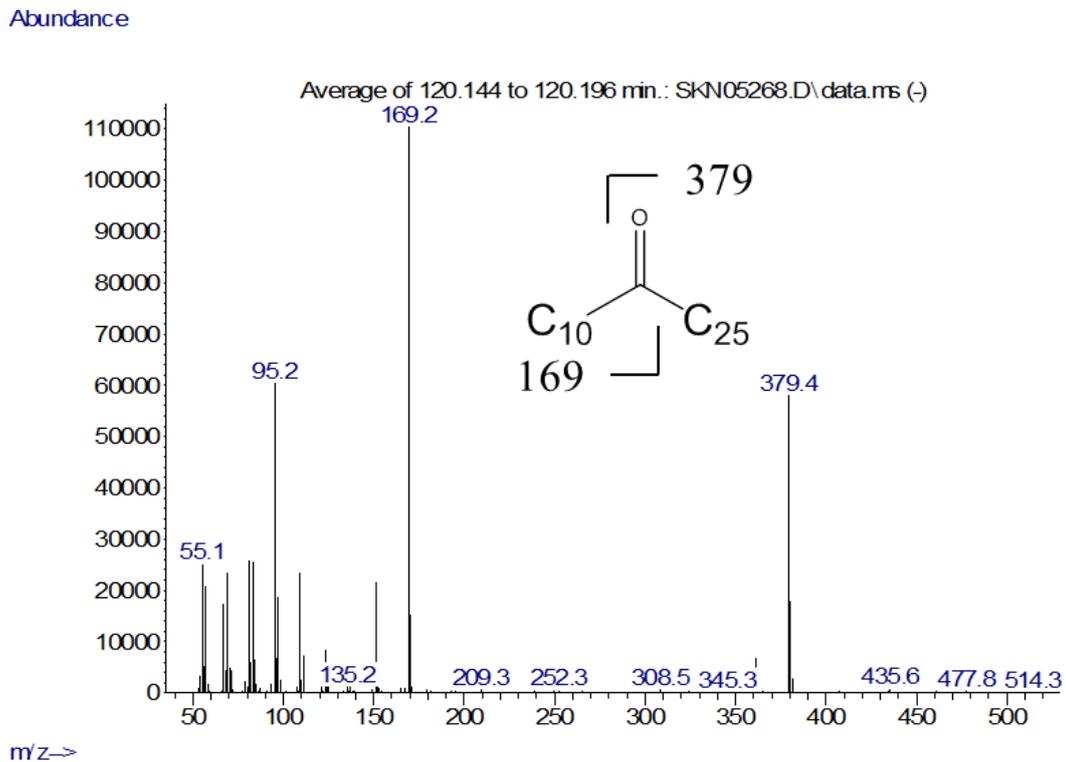
№	ЛИУ	Характеристические ионы, m/z	Структура	Общее углеродное число	мкг/мг экстракта	мкг/г насекомого
1	3180	169, 351	тетратриконтанон-11	C34	сл	
2	3188	141, 379	тетратриконтанон-9	C34	сл	
3	3281	169, 365	пентатриконтанон-11	C35	сл	
4	3285	155, 379	пентатриконтанон-10	C35	сл	
5	3384	169, 379	гексатриаконтанон-11	C36	9.0±1.3	0.54±0.08
6	3392	141, 407	гексатриаконтанон-9	C36	сл	
7	3485	169, 393	гептатриаконтанон-11	C37	сл	
8	3488	155, 407	гептатриаконтанон-10	C37	сл	
9	3590	169, 407	октатриаконтанон-11	C38	41.8±2.7	2.6±0.15
10	3685	183, 407	нонатриаконтанон-12	C39	сл	
11	3688	169, 421	нонатриаконтанон-11	C39	сл	
12	3784	197, 407	тетраконтанон-13	C40	сл	
Сумма:					50.8±3.6	3.1±0.2

сл – следовые количества

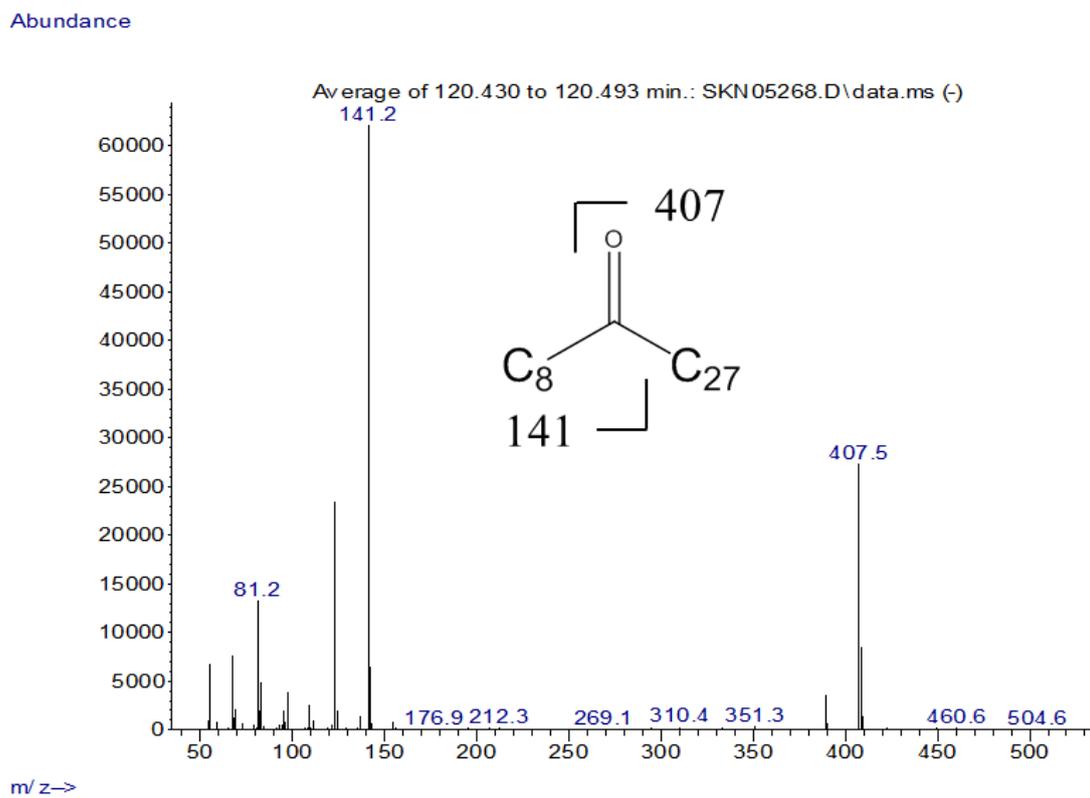
Приложение 19. Фрагмент масс-хроматограммы эпикутикулы итальянского пруса, полученный реконструкцией по характеристическим ионам с m/z 85, 141, 155, 169, 197, с пиками кетонов № 5 и 6



Приложение 20. Масс-спектр гексатриаконтанона-11 (Итальянский прус, кетон №5) и схема его распада



Приложение 21. Масс-спектр гексатриаконтанона-9 (Итальянский прус, кетон №6) и схема его распада



Приложение 22. Результаты определения показателя повторяемости концентрации основных соединений в образце эпикутикулы итальянского пруса

№ пика	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Структура	<i>n</i> -C25	<i>n</i> -C26	<i>n</i> -C27	3-метилC27 и 7,15-диметилC27	<i>n</i> -C28	<i>n</i> -C29	<i>n</i> -C30	<i>n</i> -C31	<i>n</i> -C33
Содержание, мг/мл	0.00539	0.00170	0.0287	0.00252	0.00257	0.0409	0.00206	0.0128	0.00150
	0.00543	0.00178	0.0295	0.00275	0.00289	0.0417	0.00227	0.0132	0.00164
	0.00556	0.00178	0.0300	0.00201	0.00249	0.0424	0.00229	0.0139	0.00167
	0.00556	0.00185	0.0300	0.00223	0.00293	0.0424	0.00179	0.0138	0.00181
	0.00557	0.00185	0.0301	0.00225	0.00299	0.0425	0.00231	0.0139	0.00180
	0.00547	0.00182	0.0295	0.00276	0.00294	0.0417	0.00224	0.0137	0.00185
	0.00551	0.00183	0.0296	0.00197	0.00271	0.0419	0.00226	0.0137	0.00177
	0.00547	0.00182	0.0294	0.00223	0.00292	0.0417	0.00226	0.0136	0.00175
	0.00554	0.00185	0.0299	0.00227	0.00296	0.0424	0.00217	0.0140	0.00183
	0.00548	0.00183	0.0296	0.00222	0.00293	0.0417	0.00231	0.0138	0.00177
	0.00559	0.00186	0.0300	0.00282	0.00297	0.0426	0.00230	0.0139	0.00186
0.00546	0.00181	0.0292	0.00217	0.00292	0.0412	0.00215	0.0135	0.00182	
Среднее, мг/мл	0.00550	0.00181	0.0297	0.00235	0.00285	0.0419	0.00220	0.0137	0.00176
СКО, %	1.1	2.4	1.4	12.3	5.9	1.3	6.8	2.4	5.9
Критическое значение, р	0.63	0.021	0.17	0.073	0.0019	0.162	0.0017	0.0217	0.0346
№ пика	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Структура	13,19-, 11,19- и 9,19-диметил C33	9,13,19-триметил C33	11,15-диметил C34	17-, 15-, 13- и 11-метил C35	13,19-, 11,19-, 11,25-, 11,21-диметил C35	9,13,19- и 7,17,21-триметил C35	12,20- и 11,19-диметил C36	17-, 13- и 11-метил C37	11,21- и 13,25-диметил C37
Содержание, мг/мл	0.00356	0.00443	0.00471	0.00653	0.0988	0.0150	0.00556	0.00486	0.0167
	0.00383	0.00596	0.00491	0.00657	0.0967	0.0153	0.00559	0.00495	0.0168

Приложение 22. Продолжение. Результаты определения показателя повторяемости концентрации основных соединений в образце эпикутикулы итальянского пруса

№ пика	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Структура	13,19-, 11,19- и 9,19-диметил С33	9,13,19-триметил С33	11,15-диметил С34	17-, 15-, 13- и 11-метил С35	13,19-, 11,19-, 11,25-, 11,21-диметил С35	9,13,19- и 7,17,21-триметил С35	12,20- и 11,19-диметил С36	17-, 13- и 11-метил С37	11,21- и 13,25-диметил С37
Содержание, мг/мл	0.00400	0.00477	0.00496	0.00676	0.0983	0.0156	0.00573	0.00517	0.0170
	0.00395	0.00498	0.00502	0.00681	0.0984	0.0154	0.00568	0.00513	0.0171
	0.00408	0.00500	0.00501	0.00718	0.0988	0.0159	0.00569	0.00524	0.0172
	0.00398	0.00485	0.00493	0.00682	0.0972	0.0154	0.00570	0.00518	0.0170
	0.00403	0.00484	0.00506	0.00678	0.0973	0.0156	0.00576	0.00520	0.0180
	0.00397	0.00498	0.00503	0.00674	0.0963	0.0150	0.00561	0.00508	0.0169
	0.00407	0.00498	0.00510	0.00701	0.0981	0.0164	0.00575	0.00527	0.0173
	0.00404	0.00493	0.00501	0.00684	0.0970	0.0158	0.00573	0.00523	0.0172
	0.00409	0.00502	0.00513	0.00725	0.0991	0.0163	0.00578	0.00531	0.0173
	0.00405	0.00486	0.00512	0.00690	0.0969	0.0152	0.00579	0.00523	0.0171
	0.00397	0.00497	0.00500	0.00685	0.0978	0.0156	0.00570	0.00516	0.0171
Среднее, мг/мл	0.00397	0.00497	0.00500	0.00685	0.0978	0.0156	0.00570	0.00516	0.0171
СКО, %	3.7	7.1	2.3	3.1	1.0	3.0	1.3	2.6	2.0
Критическое значение, р	0.0019	0.0014	0.0922	0.468	0.353	0.431	0.285	0.0799	0.0575

Приложение 23. Результаты определения показателя внутрилабораторной прецизионности в образце эпикутикулы личинок колорадского жука

		\bar{X} , Концентрация, мг/мл	S^2_i	$F_{\text{табл}}$	$F_{\text{кр}}$	X_m	$S_{\text{РЛ}}$, %
Пик №1 (2,6-диметилгексакозан)	$N_1=12$	0.000778	$1.7 \cdot 10^{-9}$	2.91	5.25	-	-
	$N_2=10$	0.000897	$8.9 \cdot 10^{-9}$				
Пик №2 (2- и/или 4-метилоктакозан)	$N_1=12$	0.00799	$5.9 \cdot 10^{-8}$	3.1	2.19	0.00720	15.5
	$N_2=10$	0.00641	$7.9 \cdot 10^{-8}$				
Пик №3 (2,10- и/или 2,18-диметилоктакозан)	$N_1=12$	0.0156	$2.3 \cdot 10^{-7}$	2.91	1.12	0.133	24.5
	$N_2=10$	0.0110	$2.6 \cdot 10^{-7}$				
Пик №4 (2,6-диметилоктакозан)	$N_1=12$	0.0219	$2.2 \cdot 10^{-7}$	3.1	1.93	0.0204	10.5
	$N_2=10$	0.0189	$1.1 \cdot 10^{-7}$				
Пик №5,6 (2,10,16- и 2,10,18-триметилоктакозан)	$N_1=12$	0.00630	$5.0 \cdot 10^{-8}$	3.1	1.75	0.00564	16.5
	$N_2=10$	0.00498	$2.8 \cdot 10^{-8}$				
Пик №7 (11-метилнонакозан)	$N_1=12$	0.0101	$1.0 \cdot 10^{-7}$	2.91	1.18	0.00924	13.8
	$N_2=10$	0.0083	$1.2 \cdot 10^{-7}$				
Пик №8,9 (11,17- и 11,19-диметилнонакозан)	$N_1=12$	0.00395	$2.6 \cdot 10^{-7}$	3.1	2.14	0.00358	14.6
	$N_2=10$	0.00321	$1.2 \cdot 10^{-7}$				
Пик №10 (12-метилтриаконтан)	$N_1=12$	0.000882	$3.1 \cdot 10^{-9}$	2.91	2.09	0.00076 4	21.9
	$N_2=10$	0.000646	$6.6 \cdot 10^{-9}$				
Пик №11 (2- и/или 4-метилтриаконтан)	$N_1=12$	0.00140	$1.2 \cdot 10^{-8}$	2.91	1.22	0.00119	24.4
	$N_2=10$	0.000987	$1.5 \cdot 10^{-8}$				
Пик №12 (2,12- и/или 2,18-диметилтриаконтан)	$N_1=12$	0.00188	$2.1 \cdot 10^{-8}$	2.91	1.11	0.00155	30.8
	$N_2=10$	0.00121	$2.3 \cdot 10^{-8}$				
Пик №13 (2,6-диметилтриаконтан)	$N_1=12$	0.00204	$2.2 \cdot 10^{-8}$	3.1	9.42	-	-
	$N_2=10$	0.00117	$3.7 \cdot 10^{-9}$				
Пик №14 (13-метилгентриаконтан)	$N_1=12$	0.000746	$2.8 \cdot 10^{-8}$	3.1	11.6	-	-
	$N_2=10$	0.000340	$2.7 \cdot 10^{-9}$				