

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.В. ПАЛЛАДИНА

На правах рукописи

МИЛАДЕРА ДЖОНСОН КРИСТИАН

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ ЛИНЬКИ / ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ /
НА ИНДУКЦИЮ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И
РЕПРОДУКТИВНОСТЬ ПОЛЕЗНЫХ НАСЕКОМЫХ

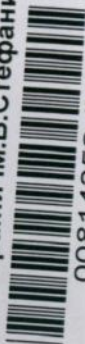
03.00.04 - биохимия

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев - 1993

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00814352 (N)

102117
Робота виконана на кафедрі органічної і
анічної хімії Українського державного
університету і в відділі біохімії стеринів
і біохімії ім. А. В. Палладина АН України

Науковий керівник : доктор біологічних наук,
професор ХОЛОДОВА Ю. Д.

Офіційні опоненти : доктор біологічних наук
Федоров А. Н. ,
доктор біологічних наук
Левицький Е. Л.

Ведуча організація – Київський університет
ім. Тараса Шевченка

Захист дисертації состоится 28 июня 1993 г.
в 14 часов на заседании специализированного совета
Д 016.07.01 по защите диссертации в Институте биохимии
им. А. В. Палладина АН Украины / 252001, г. Киев, ул. Леонтовича,
9 /

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института биохимии АН Украины

Автореферат разослан 28 мая 1993 г.

Ученый секретарь
специализированного совета *Кирсенко* Кирсенко О. В.

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последнее время в связи с перспективным использованием фитоэктистероидов — гормонов линьки и метаморфоза насекомых и ракообразных, обнаруживаемых в растениях, в качестве биостимуляторов в сельскохозяйственной энтомологии, животноводстве и медицине / Холодова, 1979, 1987, 1991; Сыров и соавт., 1980, 1986; Миронова и соавт., 1982; Джухарова и соавт., 1987 / возникла потребность в обеспечении сырьевой базы для их выделения и получения на их основе биологически активных препаратов. Известно, что растения рода *Serratula* содержат довольно значительные количества эктистероидов. В частности, есть сведения о том, что серпуха венценосная / *Serratula coronata* L. /, культивируемая на Украине, а также произрастающая в Средней Азии и на Дальнем Востоке, содержит эктистерон и α -эклизон / Холодова и соавт., 1976, 1979, 1982; Новосельская и соавт., 1981; Абубакиров, 1981 /. Однако структура других метаболитов эктистерона и их содержание в этом растении неизвестны. Неизвестны также оптимальные сроки отбора сырья для получения максимального количества этих гормонов насекомых.

Высказанное Ю.Д. Холодовой в 1979 г. предположение о целесообразности использования эктистероидов в сельскохозяйственной энтомологии для массового разведения и повышения продуктивности полезных насекомых в настоящее время успешно реализовано путем создания ряда препаратов биостимуляторов с различными наборами фитоэктистероидов / Холодова и соавт., 1990, 1991 /. Отметим однако, что использование эктистероидов в этом качестве для каждого вида насекомых должно основываться на скрупулезных исследованиях дозировки и наборов этих стероидных гормонов и на рекомендациях для их практического использования.

Ведущим энтомофагом в практике биометодов борьбы с вредителями сельского хозяйства остается трихограмма / Гринберг и соавт., 1979, 1988 /. В связи с тем, что при разведении трихограммы отмечается снижение ее жизнеспособности, ведутся работы по улучшению биологических показателей яйцеда, в том числе путем создания искусственных питательных сред. Использование и внедрение в практику сельского хозяйства препаратов на основе эктистероидов, являющихся эндогенными гормонами насекомых, их предшественниками либо метаболитами, для стимуляции искусственного разведения трихограммы является актуальной задачей биохимии и сельскохозяйственной энтомологии.

Существуют сведения о том, что изменение активности некоторых ферментов непосредственно связано с метаболизмом стероидных гормонов / Филиппович, Коньчев, 1987 /. Однако сведения о влиянии гормонов на появление или исчезновение множественных форм ферментов насекомых ограничены и фрагментарны. Для выяснения механизма гормональной регуляции множественных форм ферментов мы обратились к исследованию воздействия экистероидов различного строения на активность некоторых ферментных систем.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы явилось получение и изучение структуры гормонов линьки насекомых и их производных из растения *Serratula coronata* L. ; изучение механизмов гормональной регуляции активности множественных форм ферментов и воздействия экистерона и препаратов на его основе на репродуктивность полезных насекомых.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Выделить и идентифицировать новые экистероиды растения *Serratula coronata* L.
2. Выяснить механизм действия экистероидов на активность множественных форм ряда ферментов - кислой фосфатазы, малатдегидрогеназы и ацетилхолинэстеразы жирового тела куколок дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* G.-M.
3. Исследовать воздействие экистерона и препаратов на его основе на плодовитость энтомофага *Trichogramma embryophagum* Htg

Научная новизна. Впервые из наземной части продуцента экистероидов *Serratula coronata* L. помимо 7 известных экистероидов выделено и идентифицировано новое соединение - аугастерон С 20,22-моноацетонид с выходом 0,0007 %. Установлено активирующее воздействие экистерона на активность двух множественных форм кислой фосфатазы, одной - малатдегидрогеназы и ацетилхолинэстеразы и индукцию новых молекулярных форм двух последних ферментов в жировом теле куколок дубового шелкопряда. Показано, что ингибиторы синтеза белка на уровне транскрипции и трансляции, снижая вызванное гормоном увеличение активности изоформ ферментов, не влияли на активность форм, не чувствительных к действию экистерона. Впервые исследована структурная зависимость способности экистероидов индуцировать множественные формы ацетилхолинэстеразы. Выбран наиболее перспективный препарат, повышающий плодовитость трихограммы и увеличивающий ее репродуктивный период. Разработаны оптимальные условия его применения.

Теоретическое значение и практическая ценность работы. Данные об индукции эклистероном активности множественных форм ферментов свидетельствуют об увеличении скорости синтеза фермента *de novo*. Блокирование индукционного эффекта эклистерона ингибитором транскрипции указывает на необходимость ДНК-зависимого синтеза РНК; ингибитором трансляции - на изменение в трансляционной активности специфических мРНК. Эти данные углубляют наши представления о механизмах воздействия эклистероидов на процессы биосинтеза множественных форм ферментов насекомых.

Препараты на основе эклистероидов растений рода *Serratula* могут быть рекомендованы в качестве биостимуляторов репродуктивности трихограммы при разведении ее маточной культуры и при расселении в поле в целях ограничения численности вредителей.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на Конференции профессорско-преподавательского состава Украинской сельскохозяйственной академии / Киев, 1989 /. IV Международном симпозиуме " ANALYSIS OF STRAINS " / Венгрия, 1990 /. I Международном конгрессе " Биоконверсия органических отходов для получения биогаза, биогаза, белковых веществ и охрана окружающей среды " / Киев, 1991 /, III Всесоюзном совещании по трихограмме / Кишинев, 1991 /.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, изложенных в 7 разделах, выводов и списка литературы, включающего 244 источников, в том числе 147 иностранных авторов. Объем диссертации 136 страниц машинописи, в том числе 16 таблиц и 24 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве источников гормонов лямьки насекомых использовали наземную часть растения серпуха венценосная / *Serratula coronata* L. /, а также цветочные корзинки серпухи невооруженной / *S. inermis* Gilib /.

Растение *S. coronata* закультивировано в дендрозаповеднике " Александряч " АН Украины. *S. inermis* собирали в окрестностях г. Белая Церковь / Томлювский лес /.

В качестве объектов исследования использовали куколок дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* G.-И. и лабораторную популяцию *Trichogramma embryophagum* Htg.

Количественное определение содержания экидистерона в растениях проводили путем экстракции сырья метанолом в аппаратах Сокслета. Для разделения веществ в качестве сорбента применяли силикагель LJ-5/40, нанесенный на стеклянные пластинки 13x18 см; в качестве системы для разделения использовали смесь хлороформ-метанол / 4:1 по объему /. Детектирование пятен производили, опрыскивая пластинки специфическим реагентом-ванилин-серным реактивом. Для элюирования вещества из силикагеля использовали 96%-ный этиловый спирт. Содержание экидистерона определяли с помощью спектральных методов на приборе *Specord* на основании измерения интенсивности полосы поглощения элюата при λ_{\max} 242 нм, с помощью реакции Чугаева /Клюсдова, 1981 / при λ_{\max} 380 нм либо Либермана-Бурхарда / Неге, Saemann, 1952 / при λ_{\max} 400 нм.

Получение экидистероидов осуществляли методом колоночной хроматографии путем их градиентного элюирования подвижной фазой в системе хлороформ-метанол: 50:1;25:1;15:1;9:1;4:1;2:1. Фракция собиралась вручную либо с помощью коллектора, упаривали на ротаторном испарителе и определяли в них наличие экидистероидов методом ТСХ на пластинках *silufol*. Фракции с близкими значениями R_f объединяли, при необходимости повторно очищали на колонке при измененном значении полярности элюента, затем кристаллизовали.

Установление структуры экидистероидов проводили с помощью спектральных методов / УФ-, ИК-, ПМР-, масс-спектрометрия / и путем сравнения с эталонными образцами. Масс-спектры и элементные составы ионов получены на приборе *MX-1310* при ионизирующем напряжении 50 В и температуре 100-140°C; ИК-спектры- на спектрофотометре *UR-20* в таблетках КБг. Спектры ПМР соединений I-УП снимали на приборе *BS-567 A / 100 МГц, Tesla /*; спектры ЯМР ^1H и ^{13}C УП и X - приборах *AM-250* и *AM-300 / Bruker /*, растворитель $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 0-ТМС. Отнесения сигналов в ПМР-спектрах соединений УП и X проводили по результатам селективного двойного гомоядерного резонанса /Patt, Shooley, 1982 / а также для УП- с использованием данных спектров COSY ; для X- COSY и $\text{HET COSY} / ^1\text{H}-^{13}\text{C} /$. Спектры COSY снимались по стандартной методике матобеспечения фирмы *Bruker* с использованием ЭМ ASPECT 2000 и ASPECT 3000.

Отнесения сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C Уш и X проведено с применением методики АРТ / Бенидзе и соавт., 1987 /, для X - также с применением HET COSY / ^1H - ^{13}C /.

Синтез ацетатов экистерона для биологических исследований проводили, растворяя 50 мг экистерона *S. coronata* в 5 мл пиридина, раствор ацетилировали 3 мл уксусного ангидрида при комнатной температуре в течение двух суток. Наличие ацетатов в реакционной смеси установили с помощью ТСХ на пластинке silufol в системе хлороформ-метанол / 100:1 / при проявлении ванилин-серным реактивом. Из смеси удаляли остаток пиридина в вакууме. Сухой остаток хроматографировали на колонке с силикагелем 100/160 мкм / ЧСФР /. Ацетаты разделяли путем градиентного элюирования подвижной фазой в системе хлороформ-метанол возрастающей полярности 100:1 и 50:1. Чистые фракции кристаллизовали и определяли температуру плавления кристаллов на приборе РМЖ. Масс-спектры ацетатов экистерона определяли на приборе МХ-1310 при ионизирующем напряжении 50 В и температуре 170-190°C; спектр ПМР - на приборе ВЗ-567А / 100 МГц, Tesla /.

Индукцию ацетилхолинэстеразы, кислой фосфатазы и малатдегидрогеназы жирового тела куколок дубового шелкопряда экистероидами изучали после введения гормона в первый сегмент брюшка куколки в период постдизалаузного развития, выделения жирового тела и экстракции из него водорастворимых белков / Кутузова и соавт., 1985 /. Экстракты подвергали электрофоретическому разделению с последующим окрашиванием / Tripatti e. a., 1978 /. Белок определяли по Лоури, активность ацетилхолинэстеразы - по Элману / Ellman e. a., 1961 /, кислой фосфатазы и малатдегидрогеназы - на основании денситометрических исследований / Кутузова и соавт., 1983 /. Для определения молекулярных масс выделенных препаративным электрофорезом изоформ ацетилхолинэстеразы использовали метод электрофореза с додецилсульфатом натрия по Леммли / Laemmli, 1970 /. Различия в кинетических характеристиках множественных форм изучаемого фермента определены по константам Михаэлиса отдельных форм ацетилхолинэстеразы, выделенных из контрольных и стимулированных экистероном куколок. Линеаризацию зависимости скорости реакции от концентрации субстрата проводили по методу Лайнуивера-Берка / Lafont e. a., 1982 /. Достоверность различий рассчитывали по непараметрическому критерию Стьюдента / Лакин, 1980 /.

Для выяснения механизма гормональной регуляции активности множественных форм ферментов за 1 час до инъекции эктистерона куколкам шелкопряда вводили водный раствор актиномицина Д - ингибитора транскрипционных процессов / 5 мкг/г /³ и пурамицина - классического ингибитора трансляционных процессов / 1 мкг/г /, контрольным особям вводили соответствующее количество растворителя. Биохимический эффект эктистероидов исследовали в жировом теле через 24 часа.

Эктистерон и препараты на его основе БТК-4 и БТИ-4 исследовали в качестве биостимуляторов при разведении *Trichogramma embryophagum* Htg. Изучали влияние дозы, объема и кратности подкормки препаратами на биотические показатели трихограммы, используя метод планирования многофакторных биологических экспериментов / Менчер, Земшман, 1986 / и планы второго порядка на кубе / Палимов, 1982 /. Оценку основных биологических показателей и параметров выживания трихограммы проводили путем составления таблиц выживания / Солбриг, 1982; Birch, 1948 /. Учитывали следующие параметры: количество яиц, отложенных самкой за весь период жизнедеятельности; количество яиц, отложенных всей популяцией в каждый временный интервал x ; долю l_x живых самок к концу каждого временного интервала. Подсчитали среднюю плодовитость m_x самки за каждый временный интервал. На основе этих данных были рассчитаны основные характеристики популяции трихограммы: истинная скорость роста / биотический потенциал r / равна изменению численности самок в каждом варианте опыта за бесконечно малый интервал времени, ее определяют по формуле $\sum e^{-rx} l_x m_x = 1$, где l_x и m_x - выживаемость и плодовитость самки в возрасте x ; значение чистой скорости роста в течение одной генерации - $R_0 = \sum l_x m_x$. Она показывает, сколько самок можно ожидать от одной самки в следующем поколении. В экспериментах с телитокическими видами насекомых значение R_0 соответствует средним показателям плодовитости.

Эксперименты по использованию биостимулятора БТИ-4 для массового разведения трихограммы проводили на опытной станции в г. Кагул / Молдова / в стандартных инсектариях для разведения трихограммы объемом около 70000 см³ при комнатной температуре 25-28°C и влажности 70 ± 5 % в четырех повторностях. Возраст трихограммы не превышал трех часов. Различные концентрации препарата готовили в 20%-ном растворе сахарного сиропа либо без последнего. Подкормку

объемом 20 мл наносили пипеткой на полоску губки с марлей, которую укрепляли на внутренней стороне крышки инсектария, либо производили контактным способом путем опрыскивания яиц зерновой моли на пластинках. Процесс заражения продолжался 5 дней. По истечении 10-15 суток учитывали количество пораженных яиц зерновой моли в каждом варианте по повторностям. Статистический анализ результатов проведен по методике, описанной Менчером, 1981.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение фитостероидов различного строения и их частичный синтез. Для получения максимального содержания, используемого в биологических экспериментах экидистерона, необходимо было выбрать оптимальные сроки сбора сырья *S. coronata*. Проанализировав содержание экидистерона в цветочных корзинках и листьях в различные фазы развития, мы пришли к выводу о его повышенном содержании в листьях прикорневой розетки в начале вегетационного периода /2,06 % / и в фазе бутонизации /2,06% /. В период цветения содержание экидистерона, как мажорного компонента суммы экидистероидов, составляло в листьях 1,14 %, в период плодоношения - 0,67 % и в конце вегетации - 0,31 %.

Заметим, что в исследуемых ранее видах *S. keranthemoides* и *S. inermis* /Холодова и соавт., 1979/ максимальное содержание экидистерона наблюдается в цветочных корзинках в фазе цветения. Содержание экидистерона в органах *S. coronata* в фазе цветения было наибольшим в листьях, бутонах и цветках /0,98-1,14 %/, несколько меньше - в плодах /0,64 % / и незначительное - в стеблях /0,09 %/.

Таким образом, для получения экидистерона из *S. coronata* целесообразно использовать листья или всю наземную часть растения /кроме стебля /, собранные в фазе бутонизации. Для идентификации минорных компонентов экидистероидов *S. coronata* использовали наземную часть растения, собранного в фазе бутонизации и начала цветения.

Высушенное и измельченное сырье / 3 кг / истощивающе экстрагировали этанолом /18 л /. Экстракт сгущали до объема 500 мл и разбавляли 250 мл воды, остатки спирта отгоняли. Из водного раствора, после обработки хлороформом /4 × 50 мл/, экидистероиды извлекали бутанолом / 4 × 250 мл /. Полученный после отгонки бутанола сухой остаток хроматографировали на колонках с окисью алюминия.

Элюирование системой хлороформ - метанол 2:1 дало сумму экидис-

тероидов, перекристаллизацией которой из этилацетата получили 6,0 г эктистерона / П /, выход дан в пересчете на воздушно-сухое сырье - 0,2 % /, $C_{27}H_{44}O_7$, т. пл. 240-241°C / ацетон /, $[\alpha]_D^{20} +59,7 \pm 2^\circ$ / с 0,40; метанол / / Саатов и соавт., 1981; Galbraith, Horn, 1969 /.

Маточные растворы, полученные при перекристаллизации эктистерона, повторно хроматографировали на колонке с силикагелем, Элюированием системой хлороформ-метанол 25:1 выделили 150 мг / 0,005 % / соединения УП, $C_{33}H_{52}O_7$, т. пл. 230-232°C / из смеси ацетон-эфир /, $[\alpha]_D^{20} + 36,8 \pm 2^\circ$ / 0,30; метанол /, идентифицированного по проведенным данным, а также непосредственным сравнением с истинным образцом на ТСХ с 2,3;20,22-диацетонидом эктистерона / Запы и соавт., 1973; Galbraith, Horn, 1969 /.

Промывание колонки системой хлороформ-метанол 25:1 привело к получению 10 мг / 0,0003% / вещества У, $C_{27}H_{44}O_7$, т.пл. 217-218°C / из смеси метанол-вода /, $[\alpha]_D^{20} + 7,0 \pm 2^\circ$ / с 0,30; метанол /, отождествленного по физико-химическим константам и показателям масс- и ПМР спектров с птеростероном / Свечников и соавт., 1981; Винт е. а., 1979 /.

Использование для элюирования системы хлороформ-метанол 9:1 привело к получению фракции, содержащей смесь двух эктистероидов. Перекристаллизация этой смеси из водного метанола дала 20 мг / 0,00066 % / соединения УШ, не описанного в литературе. Т.пл. 287-288°C, $\nu_{max}^{KBr} / cm^{-1}$: 3400-3440 / OH /, 1675 / Δ^7 -6-кетогруппировка /.

Масс-спектр, m/z / % /: 520 / M⁺; 10 /, 505/20/, 502/5/, 487/10/, 469/4/, 462/98/, 445/20/, 427/33/, 426/32/, 420/33/, 411/10/, 409/20/, 402/13/, 379/20/, 361/17/, 299/12/, 281/7/, 266/33/, 185/100/, 142/58/, 127/83/, 114/33/, 109/33/, 84/60/.

Полосы поглощения гидроксильных групп /3400-3440 cm^{-1} / и кетогруппы, сопряженной с двойной связью /1675 cm^{-1} /, в ИК-спектре соединения УШ характерны для эктистероидов.

Наличие в масс-спектре пиков ионов с m/z 379 / $C_{21}H_{31}O_6$ / и 361 / $C_{21}H_{24}O_5$ / позволяет предположить, что в стероидном ядре эктистероида УШ присутствует четыре гидроксильные группы / Усманов и соавт., 1975; Балтаев и соавт., 1977; Imai е. а., 1969 /.

Кроме того, пик молекулярного иона M⁺ 520 / $C_{30}H_{48}O_7$ / и фрагменты с m/z 185 / $C_{11}H_{21}O_2$ /, 127 / $C_8H_{15}O$ / и 109 / C_8H_{13} /

свидетельствуют о том, что имеющиеся в боковой цепи две гидроксильные группы включены в изопропиленовую группировку /Koreeda e. a., 1959/. Таким образом, молекула нового фитостероидина содержит шесть оксигрупп, из которых четыре находятся в стероидном ядре, а две - в боковой цепи и представлены ацетонидной группой.

Из табл. I следует хорошее совпадение значений химических сдвигов /ХС/ сигналов, расположенных в области от 3,4 до 6,3 м.д., для эдикстероида III и туркестерона /X/ /Усманов и соавт., 1975/. Этот факт указывает на то, что функциональные элементы стероидного ядра нового эдикстероида по своей природе и местоположению идентичны таковым туркестерона.

Отметим и значительное смещение в слабое поле сигнала I - He в спек-

Таблица I
Химические сдвиги протонов соединений III-X
/ δ , м.д., C_5D_5N , 0-TMC /

Протон :	Соединение		
	III	IX	X
I-He	3,41, дп, $J_{1e,1a} = 13,5$ $J_{1e,2a} = 4,5$		3,39, дп, $J_{1e,1a} = 13,0$ $J_{1e,2a} = 4,1$
2-Ha	4,53:м, $w_{1/2} = 22^A$		4,55:м, $w_{1/2} = 22^F$
3-He	4,18:м, $w_{1/2} = 8$		4,13:м, $w_{1/2} = 9$
7-H	6,27:д, $J_{2,3a} = 2,7$		6,24: $J_{2,3a} = 2,9$
9-H	3,32:м, $w_{1/2} = 16,5^B$		3,30:м, $w_{1/2} = 16,0^D$
11-Ha	4,53:м, $w_{1/2} = 22^A$		4,55:м, $w_{1/2} = 22^F$
22-H	3,32:м, $w_{1/2} = 16,5^B$		3,30:м, $w_{1/2} = 16,0^D$
19-CH ₃	1,05:с	1,21:с	1,22:с
19-CH ₃	1,23 ^B :с	1,27:с	1,26:с
21-CH ₃	1,49:с	1,51:с	1,54:с
26-CH ₃	0,77:л, $J_{26,25} = 6,5$	0,82:л, $J = 5$	1,32:с
27-CH ₃	0,79:л, $J_{27,25} = 6,5$	0,82:л, $J = 5$	1,32:с
Протоны ацетонидной группы	1,45, 1,23 ^B		

Сигналы, отмеченные одинаковыми буквенными индексами, взаимно налагаются. Значения КССВ и $w_{1/2}$ даны в герцах.

трах УШ и X по сравнению с экистероном / П // 1-He δ_{H} -2,14 / Girault, Lafont., 1988 /, $\delta_{\text{УШ}}$ - 3,41, δ_{X} - 3,38 м.д. /. Этот эффект объясняется влиянием 11 α -ОН-группы на 1-He, которое проявляется при использовании пиридина как растворителя / Свечников и соавт., 1981, Demarco e.a., 1968 /.

Сравнительный анализ спектров ЯМР ^{13}C / табл.2 / туркестерона /X/, авг.стерона С /1X/ и соединения УШ подтверждает, что в тетрациклической части нового экистероида гидроксильные группы расположены в положениях 2 β , 3 β , 11 α и 14 α .

Таблица 2

Химические сдвиги атомов углерода соединений УШ - X
/ δ , м.д., $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}_2\text{O}$ - ТМС /

Атом : - Соединение				Атом : Соединение			
угле-:				угле-:			
рода :	УШ :	1X :	X :	рода :	УШ :	1X :	X
1	39,48	39,6	39,87	17	49,72	50,0	50,07
2	68,37	68,2	68,53	18	18,23	19,0	19,00
3	68,09	68,5	68,25	19	24,81	24,9	24,96
4	32,86	32,9	32,95	20	84,81 ^X	76,9	76,95
5	52,43	52,5	52,52	21	22,24 ^{XX}	21,6	21,70
6	203,68	204,2	204,21	22	81,94	76,9	77,60
7	122,37	122,2	122,33	23	27,10	30,3	27,53
8	163,68	164,4	164,49	24	36,86	37,2	42,65
9	42,69	42,8	42,79	25	28,24	28,2	69,77
10	39,81	39,8	39,62	26	22,81 ^{XX}	23,4	30,05
11	68,83	68,9	68,95	27	22,43 ^{XX}	22,5	30,20
12	43,83	44,2	44,20	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$	29,37		
13	47,82	48,3	48,28		106,93		
14	84,13 ^X	84,3	84,32				
15	31,75	31,9	31,96				
16	22,13	21,6	21,65				

Отнесения химических сдвигов углеродных атомов, сигналы которых отмечены одинаковыми индексами, могут быть взаимно обратными.

Мультиплетность и ХС метилных групп- CH_3 -21 / синглет / , CH_3 -26/27 / дублеты / и ХС Н-22 / табл.1 / , а также приведенные выше данные масс-спектра дают основание считать, что оксигруппы боковой цепи экистероида УШ расположены при 20 и 22 углеродных атомах и включены в ацетонидную группировку.

Совокупность приведенных данных приводит к выводу, что экистероид УШ является 20,22-моноацетонидом амгастерона С / $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_7$ /, не описанным ранее в литературе.

Маточный раствор, оставшийся после выделения соединения УШ, рехроматографировали на колонке с силикагелем, промывая системой хлороформ-метанол 9:1. Выделили 50 мг / 0,018 % / 20,22-моноацетонид экистерона / У1 /, $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_7$, т.пл. 220-222°C / из смеси этилацетат-гексан /, $[\alpha]_D^{20} + 58,9 \pm 2^\circ / c 0,32$; метанол / Саатов и соавт., 1987 /.

Дальнейшее элюирование основной колонки системой хлороформ-метанол 4:1 привело к получению 30 мг / 0,001 % / полипоидина В / Ш /, $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_8$, т.пл. 250-252°C / ацетон /, $[\alpha]_D^{20} + 93,2 \pm 2^\circ / c 0,23$; метанол / / Саатов и соавт., 1981; Jizba. e.a., 1967 /.

Продолжая элюировать колонку системой хлороформ-метанол 4:1 мы получили 40 мг / 0,001% / экилизона / I /, $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_6$, т.пл. 236-237°C, $[\alpha]_D^{20} + 63,6 \pm 2^\circ / c 0,83$; метанол / / Новосельская и соавт., 1981 /.

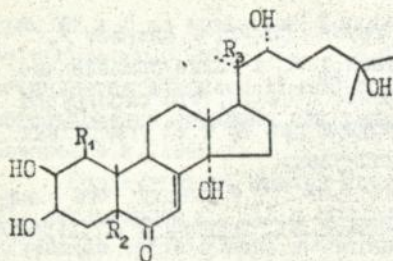
Применение системы хлороформ-метанол-вода 4:1:0,1 позволило выделить 20 мг / 0,0006 % / интегристерона А / IY /, $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_8$, т.пл. 246-248°C / этилацетат-метанол /, $[\alpha]_D^{20} + 36,0 \pm 2^\circ / c 0,22$; метанол / Балтаев и соавт., 1977; Саатов и соавт., 1981 /- и 8-мг экистероида "Б" неустановленного строения.

Структурные формулы идентифицированных экистероидов *S. coronata*, а также использованных для идентификации амгастерона С и туркестерона представлены на рис. 1.

Таким образом, мы впервые описали новое соединение - 20,22-моноацетонид амгастерона С, относящееся к классу фитоэкистероидов.

Реакция ацетилирования 50 мг экистерона *S. coronata* привела к получению двух продуктов с R_f 0,68 и 0,33 при ТСХ-хроматографировании в системе хлороформ-метанол 100:1.

Разделение вестев на колонке с силикагелем давало при элюи-

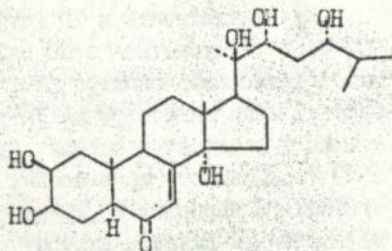


1. $R_1=R_2=R_3=H$

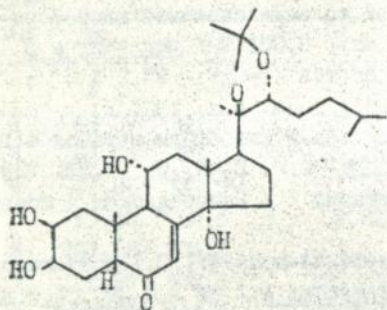
II. $R_1=R_2=H, R_3=OH$

III. $R_2=R_3=OH, R_1=H$

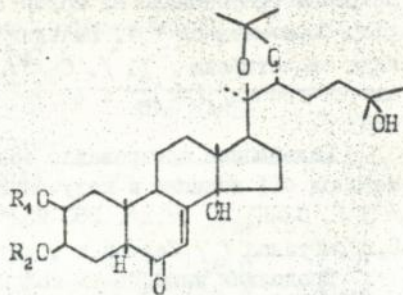
IV. $R_1=R_3=OH; R_2=H$



У

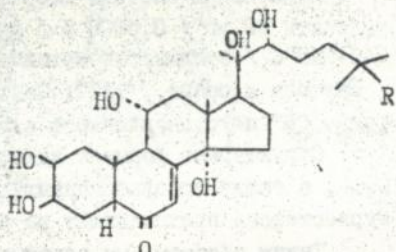


УШ



VI. $R_1=R_2=H$

VII. $R_1, R_2 =>CMe_2$



IV. $R=H$

X. $R=OH$

Рис. 1. Структурные формулы идентифицированных экистероидов *S. coronata* и использованных для идентификации авгастерона С и туркестерона

1. ∞ -Экизон

II. Экистерон

III. Полипидин В

IV. Интегристерон

У. Итеростерон

VI. 20,22-Моноацетонид экистерона

VII. 2,3;20,22-Диацетонид экистерона

УШ. 20,22-Моноацетонид авгастерона С

IX. Авгастерон С

X. Туркестерон .

ровании системой хлороформ-метанол 100:1 15 мг 2,3,22,25-тетраацетата эклистерона $C_{35}H_{52}O_{11}$ / $R_f 0,68$ / , т.пл. 205-207 °С / из смеси ацетон-гексан / , $[\alpha]_D^{24} + 59,5^\circ$ / с 0,89; метанол / . По литературным данным / Абубакиров, 1975; Зацын и соавт., 1971 / т.пл. соответствует 204,5-206,0 °С , $[\alpha]_D^{19} + 59,6^\circ$ / ацетон-гексан / .

При экировании системой хлороформ-метанол 50:1 получено 29 мг 2,3,22-триацетата эклистерона $C_{33}H_{50}O_{10}$ / $R_f 0,33$ / , т.пл. 197-199 °С / эфир / , $[\alpha]_D^{24} + 57,6^\circ$ / с 0,75; метанол / . Литературные данные / Абубакиров, 1975; Зацын и соавт., 1971 / ; т.пл. 198,5-199 °С , $[\alpha]_D^{19} + 59^\circ$ / эфир / .

Индукция активности множественных форм кислой фосфатазы и малатдегидрогеназы жирового тела куколок дубового шелкопряда под воздействием эклистерона. Известно, что гормональная регуляция экспрессии генов, контролирующих синтез определенных белков и ферментов, направлена на обеспечение дифференцировки клеток в процессе онтогенеза и адаптивных реакций организма насекомых. Однако сведения о влиянии гормонов на генезис множественных форм ферментов насекомых ограничены и фрагментарны.

Как показали проведенные нами электрофоретические исследования / табл.3 / , в жировом теле куколок дубового шелкопряда выявлено пять множественных форм кислой фосфатазы с $R_f 0,10$; 0,25 ; 0,30 ; 0,54 и 0,65. Изучение влияния эклистерона на активность кислой фосфатазы показало, что стероидный гормон проявляет селективное действие. Так, наиболее отзывчивыми к действию эклистерона оказались формы фермента с $R_f 0,25$ и 0,65. Активность отмеченных форм через 24 часа после инъекции личиночного гормона возрастает на 33 и 65 % соответственно. На активность низкоподвижной формы / $R_f 0,10$ / эклистерон практически не оказывает воздействия, в то время как по отношению к двум остальным формам с $R_f 0,30$ и 0,54 он проявляет почти равный ингибирующий эффект.

Индукцируемое стероидным гормоном возрастание активности двух форм кислой фосфатазы ингибируется в опытах с актиномицином Д и пурамицином. Таким образом, введение куколкам дубового шелкопряда ингибиторов синтеза белка на транскрипционном и трансляционном уровнях за 1 час до инъекции эклистерона снижает вызванное гормоном увеличение активности отмеченных форм кислой фосфатазы, что дает основание полагать об увеличении синтеза ферментативного белка de novo. Отмечается, что на активность форм кислой фосфатазы, не-

чувствительных к действию эрдистерона, актиномицин Д и пуромидин оказывают незначительное воздействие, либо не влияют.

Таблица 3

Влияние эрдистерона, актиномицина Д и пуромидина на активность /условн. единицы/ множественных форм кислой фосфатазы и малатдегидрогеназы жирового тела куколок дубового шелкопряда

R_f форм ферментов :	Эрдистерон /доп- : Эрдистерон + : Эрдистерон +	Контроль : оин. " + " и " - изме- : актиномицин Д : пуромидин	нения активности :	актиномицин Д :	пуромидин
			% к контролю :		
Кислая фосфатаза					
0,10	3,57±0,05	3,46±0,04		3,22±0,05 ^X	2,60±0,06 ^{X/XX}
0,25	24,03±0,41	32,07±1,10 ^X	+33,4	25,08±0,78 ^{XX}	25,74±0,89 ^{XX}
0,30	7,38±0,09	6,20±0,12 ^X	-16,0	6,43±0,11 ^X	6,79±0,08 ^{X/XX}
0,54	13,14±0,53	10,94±0,23 ^X	-16,8	12,13±0,82	11,65±0,12 ^X
0,55	6,46±0,09	10,66±0,17 ^X	+65,0	6,25±0,08 ^{XX}	6,78±0,08 ^{XX}
Суммарная активность	54,58±2,17	63,33±1,93 ^X	+16,0	53,11±2,03 ^{XX}	53,56±1,05 ^{XX}
Малатдегидрогеназа					
0,08	9,70±0,25	9,97±0,27	-	10,14±0,13	10,23±0,16
0,25	7,08±0,15	8,55±0,10 ^X	+20,8	8,07±0,85	8,37±0,12 ^X
0,28	0,0	3,42±0,12 ^X	инд.	0,0	0,0
0,44	12,10±1,40	9,91±0,36 ^X	-18,1	11,13±1,69	10,75±2,34
Суммарная активность	28,88	31,85	+10,3	29,34	29,35

Примечание: инд. - индуцибельная форма малатдегидрогеназы; х/хх - различия по отношению к контролю и действию эрдистерона соответственно достоверны, $p < 0,005$.

Активность малатдегидрогеназы выявляется на колонках ПААГ в виде трех молекулярных форм в контрольных образцах и четырех - в опытных. Как следует из табл.3, активность молекулярной формы малатдегидрогеназы с $R_f 0,25$ возрастает в опытных образцах на 20 %. Практически без изменений остается активность наиболее высокомолекулярной формы фермента / $R_f 0,08$ /, в то время, как таковая самой

электрофоретически подвижной / R_f 0,44/ ингибируется. Следует отметить тот факт, что в этот период исследования эклистерон вызывает появление новой молекулярной формы малатдегидрогеназы с R_f 0,28, обладающей невысокой активностью. Этот индукционный эффект стероидного гормона блокируется актиномицином Д, что указывает на необходимость ДНК-зависимого синтеза РНК для его реализации. Ингибирующее влияние пуromидина свидетельствует об изменениях в трансляционной активности специфических мРНК. Достоверное влияние актиномицина Д на индукцию активности молекулярной формы малатдегидрогеназы с R_f 0,25 не было зарегистрировано нами, в то время как пуromидин не снимал эффекта активации.

Таким образом, проведенная серия экспериментов с использованием в качестве модели для изучения гормональной индукции биосинтеза кислой фосфатазы и малатдегидрогеназы жирового тела куколок дубового шелкопряда продемонстрировала, что эклистерон вызывает увеличение суммарной активности ферментов на определенных фазах развития насекомого. Это возрастание суммарной активности при инъекции личиночного гормона обусловлено, в первую очередь, значительным увеличением содержания двух из пяти индивидуальных фосфатаз и новообразованной формы малатдегидрогеназы. Введение ингибиторов транскрипционных и трансляционных процессов блокирует индуцибельное действие эклистерона, что указывает на необходимость прежде всего ДНК-зависимого синтеза РНК для реализации гормонального воздействия.

Эклистероид-индуцируемая активность ацетилхолинэстеразы жирового тела куколок дубового шелкопряда. Существуют данные об увеличении активности ацетилхолинэстеразы под влиянием эклистерона /Филиппович, Коничев, 1967/. У насекомых этот фермент существует в виде нескольких от 2 до 8-изоформ. Характер влияния эклистерона на множественные формы ацетилхолинэстеразы практически не изучен.

Исследования зависимости удельной активности ацетилхолинэстеразы от продолжительности действия эклистерона на организм насекомого показали, что через 6 часов после введения препарата удельная активность фермента возрастает на 55%. При более длительном воздействии гормона происходит дальнейшее увеличение активности фермента. Она стабилизируется приблизительно через 24 часа после введения, достигая значения на 153 % больше исходного уровня.

Такое постепенное во времени увеличение удельной активности ацетилхолинэстеразы можно отнести за счет увеличения биосинтеза

фермента.

Это предположение было проверено нами путем блокирования синтеза фермента на этапах транскрипции или трансляции путем введения антибиотиков - актиномицина Д и пурамицина за час до введения экдистерона. Из рис. 2 следует, что оба антибиотика заметно снижают эффект гормона как индуктора ацетилхолинэстеразы. Так, при введе-

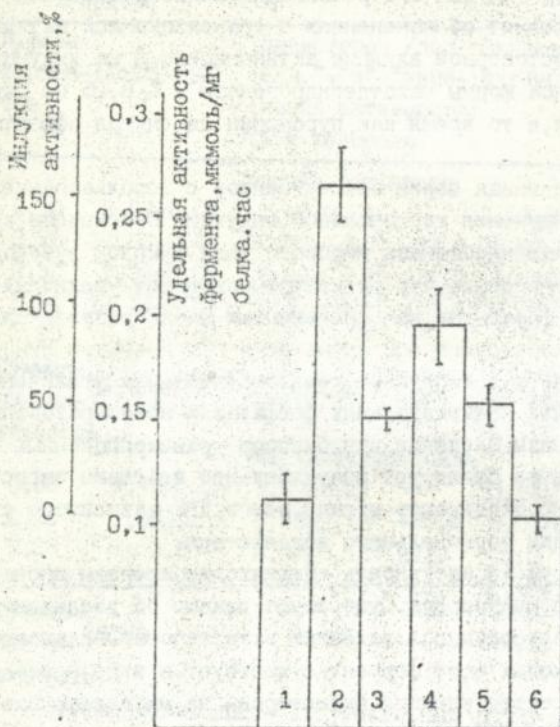


Рис. 2. Удельная активность ацетилхолинэстеразы жирового тела куколок дубового шелкопряда через 24 часа после введения: 1- 7%-ного этилового спирта; 2- экдистерона; 3- актиномицина Д и экдистерона; 4- пурамицина и экдистерона; 5- дифлорсензурина и экдистерона; 6- контроль.

нии актиномицина Д, избирательно блокирующего транскрипцию, воздействие экдистерона увеличило активность ацетилхолинэстеразы только на 45%, а при введении пурамицина, блокатора трансляции, гор-

мональная индукция фермента составила 89% /рис.2 /.

Таким образом, вероятно, увеличение удельной активности фермента обусловлено его синтезом. Подобный результат получен и при введении ингибитора синтеза хитина - дифторбензурана, который достаточно эффективно блокировал индукцию ацетилхолинэстеразы, не являясь при этом ингибитором фермента. Механизм блокирования синтеза белка дифторбензураном, по-видимому, связан с уменьшением проницаемости клеточной мембраны для нуклеозидов /Филиппович и соавт. 1988 /, что приводит к затруднению синтеза ДНК и РНК.

Нами установлено, что в результате воздействия экдистерона появилась новая изоформа ацетилхолинэстеразы, имеющая несколько большую электрофоретическую подвижность - 0,37 против 0,32 у исходной формы. Кроме того, отмечено увеличение активности изоформы, характерной для контрольных животных. При предварительном ингибировании синтеза белка дифторбензураном, актиномицином Д или пуромицином, гормональное стимулирование куколок не приводило к появлению новой изоформы фермента, что еще раз подтверждает мысль о ключевой роли биосинтеза фермента в увеличении его активности /рис.3 /. Результаты определения кинетических характеристик / K_m , V_{max} / изоформ ацетилхолинэстеразы свидетельствуют об отсутствии существенных различий между ними.

Воздействие экдистероидов различной структуры на индукцию изоформ ацетилхолинэстеразы /рис.3 / показало образование 2 новых форм фермента с увеличением его активности под влиянием 2,3,22-триацетата экдистерона, а также увеличение активности фермента под влиянием других исследованных экдистероидов, особенно существенное в случае 2-дезоксидекдистерона / табл.4 /.

Молекулярная масса изоформ ацетилхолинэстеразы в денатурирующих условиях определена при сравнении относительной электрофоретической подвижности фермента с подвижностями маркерных белков.

Молекулярные массы изоформ 1, 2 и 3 составляли 68,71 и 90 кДа соответственно. При разрушении дисульфидных связей меркаптоэтанолом изменение молекулярной массы не происходило, что свидетельствует о том, что фермент элизируется из ПАА-геля после препаративного электрофореза в виде элементарных субъединиц.

Полученные данные существенно дополняют представления о механизме гормональной индукции множественных форм ферментов у насекомых.



Рис.3. Энзимограммы множественных форм ацетилхолинэстеразы в жировом теле куколки дубового шелкопряда:1-эклистерон и дифторбензурон;2-2,3,22-триацетатэклистерона;3- α -эклизон;4-2-дезоксид- α -эклизон;5-эклистерон;6-2-дезоксидэклистерон;7-контроль.

Таблица 4

Относительная подвижность изоформ ацетилхолинэстеразы и их активность

ИМ: Название препарата	Относительная подвижность изоформ ацетилхолинэстеразы, R_f			Активность ацетилхолинэстеразы, мкмоль/мг белка за 1 час		
	1	2	3	1	2	3
1. Контроль	0,32			0,199		
2. Эклистерон	0,32	0,37		0,304	0,662	
3. α -эклизон	0,32			0,993		
4. 2,3,22-Триацетатэклистерона	0,32	0,37	0,40	0,385	0,875	0,597
5. 2-Дезоксиэклистерон	0,32			1,258		
6. Дифторбензурон и эклистерон	0,32			0,397		
7. 2-Дезокси- α -эклизон	0,32			0,331		

Влияние препаратов на основе эклистероидов растений рода
Serratula на репродуктивность Trichogramma embryophagum Htg

Для улучшения биологических свойств трихограммы используют различные приемы, один из которых — подкормка имаго биологически активными веществами. Значительный интерес в этом отношении представляют гормоны линьки и метаморфоза насекомых — эклистероиды. Под их контролем находится большинство процессов, связанных с размножением и дифференцировкой клеток, в том числе созревание половых клеток.

Нами разрабатывалась биотехнология применения фитогормонов для массового разведения трихограммы.

Исследовали эклистерон, препарат БТК-4, полученный из растения *S. coronata* и содержащий α -эклизон, полипидин В, интегристерон А и эклистерон в соотношениях 0,5:0,5:0,3:100; препарат БТИ-4, полученный из растения *S. inermis* и содержащий 2-дезоксизэклистерон, полипидин В, интегристерон А, 26-оксиэклистерон и эклистерон в соотношениях 0,05:1:1:0,25:100. Изучали влияние различных концентраций эклистерона и БТК-4 в сахарном сиропе / x_1 / , объемного веса подкормки / x_2 / и времени контакта — экспозиции трихограммы с препаратом / x_3 / на основные биологические показатели энтомофага. Контрольные партии трихограммы подкармливали чистым сахарным сиропом. На основе данных экспериментов получены математические модели зависимости биотического потенциала / g / и чистой скорости роста / R_0 / от исследуемых факторов.

Для эклистерона:

$$g = 0,20 - 0,02x_1 + 0,01x_2 + 0,004x_3 + 0,008x_1x_2 - 0,17x_1x_3 + 0,03x_2x_3 - 0,02x_1^2 - 0,02x_2^2 + 0,04x_3^2 \quad /1/$$

$$R_0 = 8,67 - 1,45x_1 + 0,95x_2 + 1,17x_3 - 0,77x_1x_2 - 2,04x_1x_3 + 2,66x_2x_3 - 1,10x_1^2 - 0,18x_2^2 + 4,31x_3^2 \quad /2/$$

Здесь и далее уравнения представлены в кодированном виде при изменении значений x_1 , x_2 и x_3 от -1 до 1.

Коэффициент детерминации между фактическими и расчетными по моделям значениями находится в пределах 0,6 — 0,8. Анализ остатков /Аффи, Эйзен, 1982/ выявил адекватность полученных моделей.

Одновременно были поставлены отдельные опыты с концентрациями препаратов, превышающими в десятки раз используемые при планировании эксперимента. Остальные факторы фиксировали на среднем уровне.

Для графического анализа моделей 1-2 были проведены сечения через поверхность отклика /рис.4/.

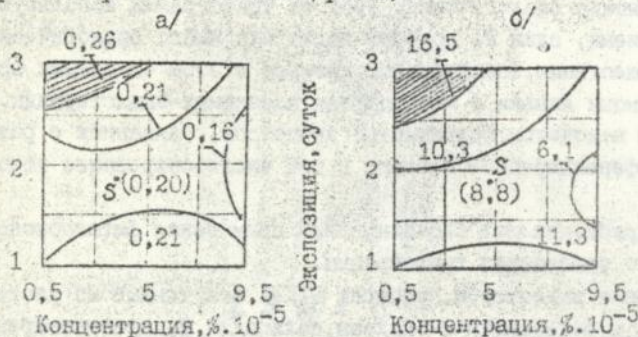


Рис.4. Зависимость биотического потенциала r /а/ и чистой скорости роста R_0 /б/ трихограммы от концентрации $/x_1/$ и экспозиции $/x_2/$ экидистерона при объемном весе подкормки $x_2 = 5$ мкл.

Наибольшее значение r /0,26/ и R_0 /16,5/ достигаются при 3-х суточной экспозиции трихограммы с препаратом, содержащим экидистерон в концентрации $0,5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-5} \%$. Увеличение концентрации экидистерона до $3 \cdot 10^{-4} \%$ приводит к росту биотического потенциала $/r=0,26/$ и скорости роста $/R_0=25,66/$. Однако увеличение данных показателей можно достичь и при более низкой концентрации экидистерона, за счет экспозиции трихограммы с препаратом, превышающей трое суток.

Наибольшие биотический потенциал $/r=0,18/$ и скорость роста $/R_0=8/$ достигаются при 3-х суточной экспозиции трихограммы с препаратом, содержащим БТИ-4 в концентрации $0,5 \cdot 10^{-5} - 9,5 \cdot 10^{-5} \%$. Однако статистический анализ выявил существенные различия с контролем лишь в случае увеличения концентрации препарата до $1,5 \cdot 10^{-4} \%$.

Схема опыта с препаратом БТИ-4 несколько упрощена. Объемный вес подкормки во всех вариантах опыта составлял 5 мкл. На основе данных эксперимента получены математические модели зависимости r и R_0 трихограммы от концентрации $/x_1/$ и экспозиции $/x_2/$ БТИ-4 :

$$r = 0,31 - 0,01x_1 - 0,005x_2 + 0,007x_1x_2 + 0,02x_1^2 - 0,01x_2^2 \quad /3/$$

$$R_0 = 31,75 - 2,39x_1 - 0,41x_2 + 2,93x_1x_2 + 5,73x_1^2 - 4,76x_2^2 \quad /4/$$

Анализ графика зависимости биотического потенциала r и скорости роста R_0 энтомофага от концентрации $/x_1/$ и экспозиции $/x_2/$ БТИ-4 показал, что наибольшее значение $r = 0,34$ и $R_0 = 40$ достигается при экспозиции близкой к двум суткам и минимальной концентрации $0,5 \cdot 10^{-5} \%$. Увеличение концентрации БТИ-4 с $0,5 \cdot 10^{-5} \%$ до

2.10^{-4} угнетающе влияет на биологические показатели трихограммы. Различие между значениями r и R_0 в опыте и контроле, при высоких значениях концентрации БТИ-4 не установлено.

Угнетающее действие высоких концентраций фитогормонов на плодовитость трихограммы отмечено также в работе Руснак и соавт., / 1986 /.

Таким образом, предварительные результаты, полученные нами, показывают, что подкормка трихограммы эклистероном и препаратами на основе эклистероидов вызывает повышение ее плодовитости, причем стимуляция плодовитости не связана с большей продолжительностью жизни самок /как в опыте, так и в контроле период откладывания основной массы яиц составлял 3-5 дней/.

С целью установления оптимальных сочетаний изучаемых факторов при исследовании эффекта препаратов БТК-4 и БТИ-4 на основные демографические показатели трихограммы мы широко варьировали концентрации препаратов.

Значения $r = 0,30$ и $R_0 = 35$ достигаются при максимальных концентрациях препарата / $19.10^{-5}\%$ / и экспозиции / 5 суток / и существенно превышают биологические показатели, полученные в предыдущем исследовании. Однако рост r и R_0 наблюдается на фоне увеличения кратности подкормки до 5 суток и не связан с препаратом. Статистический анализ результатов не выявил существенного различия в опыте и контроле.

С препаратом БТИ-4 проводили эксперименты вокруг двух зон максимума, которые могли бы, по нашему мнению, обеспечить максимальное значение изученной функции.

В первой серии опыта биотический потенциал 0,27 достигается при минимальной дозе $5.10^{-5}\%$ препарата и одно-двукратной подкормке трихограммы. Зависимость скорости роста от исследуемых факторов характеризуется двумя зонами максимума 25,1 и 29,8. Анализ динамики распределения L_x, m_x показывает, что исследуемые дозы препарата оптимально воздействовали на возрастную выживаемость L_x и плодовитость m_x трихограммы.

В табл. 5 представлены условия, матрица планирования и результаты опытов с БТИ-4 во второй серии.

На основе данных табл. 5 получены математические модели :

$$r = 0,235 + 0,007x_1 + 0,013x_2 - 0,022x_1x_2 + 0,038x_1^2 - 0,004x_2^2 \quad / 5/$$

$$R_0 = 17,074 + 3,572x_1 + 3,260x_2 - 7,097x_1x_2 + 8,768x_1^2 + 1,783x_2^2 \quad / 6/$$

Условий, матрица планирования и результаты опытов с препаратом БТИ-4 во второй серии

Показатель	Факторы		Результаты			
	x_1 % · 10 ⁻⁵	сут. · 2 ⁰	r	\bar{r}	R ₀	\bar{R}_0
Основной уровень	1,5	2				
Интервал варьирования	1,45	1				
Верхний уровень	2,95	3				
Нижний уровень	0,05	1				
Кодированные значения факторов	x_1	x_2				
Опыты :						
1	+	+	0,260	0,267	25,27	27,36
2	-	+	0,281	0,298	28,23	34,41
3	+	-	0,295	0,287	39,18	35,03
4	-	-	0,226	0,227	13,75	13,70
5	+	0	0,279	0,280	27,36	29,41
6	-	0	0,284	0,266	28,40	22,27
7	0	+	0,268	0,244	30,39	22,12
8	0	-	0,212	0,219	11,40	15,60
9	0	0	0,219	0,235	13,00	17,00
Коэффициент детерминации / % /			79		71	

Наибольший биотический потенциал /0,29-0,30/ и скорость роста /34-35/ трихограммы достигаются как при максимальной дозе /2,95 · 10⁻⁵ %/ препарата и однократной подкормке, так и минимальной дозе /0,05 · 10⁻⁵ %/ и трехкратной подкормке. Последнее сочетание факторов менее приемлемо для массового разведения трихограммы /рис. 5 /.

Применение БТИ-4 в исследуемых дозах существенно повышает плодовитость и увеличивает цикличность образования ооцитов у самок трихограммы. Даже однократная подкормка /рис. 6, кривые 1-4/ способствует нарастанию плодовитости в течение продолжительного времени. Контрольный вариант характеризуется одним, резким, быстро затухающим пиком. Отмеченное свойство гормонального препарата особенно важно при расселении трихограммы в поле.

Таким образом, нами выявлен перспективный препарат БТИ-4, от-

личающийся наличием 2-дезоксидеокси- и 26-оксиэтилдестероидов, однократная подкормка которых трихограммы существенно повышает ее плодовитость на 40%. При его применении установлена возможность увеличения репродуктивного периода у трихограммы, что может найти применение как при массовом разведении, так и при расселении энтомофага в поле.

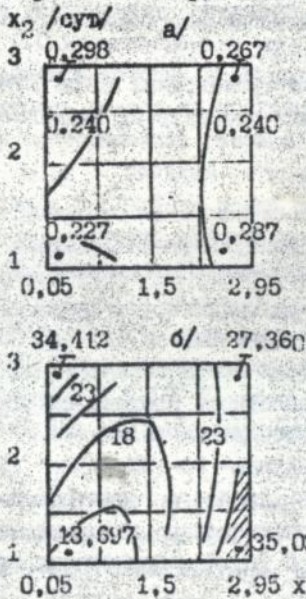


Рис. 5. Зависимость биотического потенциала r/a и скорости роста R_0/d трихограммы от концентрации $x_1/$ и экспозиции $x_2/$ препарата БТИ-4.

Массовое разведение маточной культуры *T. embryophagum* Htg

С целью внедрения в практику БТИ-4 в качестве биостимулятора при массовом разведении трихограммы необходимо было провести исследования в условиях опытной станции. Использовали дозы препарата БТИ-4 $3 \cdot 10^{-5}\%$ и $0,05 \cdot 10^{-5}\%$ с кратностью подкормки трихограммы 1 и 3 суток соответственно. Анализ полученных результатов показал, что во всех вариантах опыта наблюдалось повышение плодовитости трихограммы. Только в одном варианте, где препаратом опрыскивали яйца зерновой моли и трихограмму не подкармливали, отмечено снижение плодовитости энтомофага по сравнению с соответствующим контролем. Этот факт показывает, что насекомые должны получать гормональный препарат вовнутрь в виде корма. Вероятно, что трихограммы не охотно

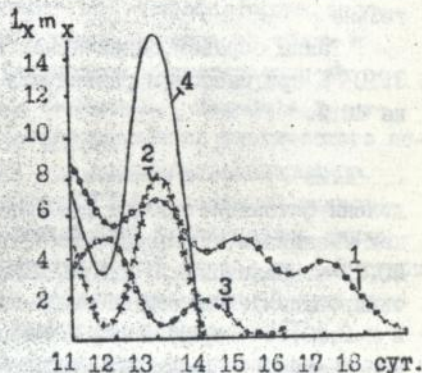


Рис. 6. Влияние БТИ-4 на динамику яйцепродукции трихограммы: 1- доза $2,95 \cdot 10^{-5}\%$, 2- $1,5 \cdot 10^{-5}\%$, 3- $0,05 \cdot 10^{-5}\%$, 4- контроль/однократная подкормка сахарным сиропом /.

откладывают свои яйца на влажные яйца хозяина. Существенное различие установлено при сравнении опытных данных вариантов, где трихограмму подкармливали дозами БТИ-4 $3 \cdot 10^{-5}\%$ и $0,05 \cdot 10^{-5}\%$ с кратностью подкормки 1 и 3 суток, с соответствующими контролями, что подтверждает полученные нами выше результаты. При сравнении этих вариантов между собой установлено, что разница между ними незначительна.

Таким образом, однократная подкормка трихограммы дозой БТИ-4 $3 \cdot 10^{-5}\%$ при массовом разведении позволяет повысить ее плодовитость на 40 %.

ВЫВОДЫ

1. Из *Serratula coronata* L. для биологических исследований выделены фитоэкдистероиды различного строения, идентифицированные как α -эклизон, экдистерон, полиподин В, интегристерон А, птеростерон, 20,22-моноацетонид и 2,3;20,22-диацетонид экдистерона. Путем ацетилирования экдистерона получены и идентифицированы его 2,3,22-три- и 2,3,22,25-тетраацетаты. Оптимальные сроки сбора сырья для получения мажорного компонента экдистерона - известного гормона линьки насекомых - начало вегетации и стадия бутонизации растения.

2. С помощью спектральных методов анализа - УФ-, ИК-, ЯМР-/ ^1H и ^{13}C /, масс-спектрометрии с использованием двойного гомоядерного резонанса в наземной части растения идентифицировано новое, не описанное в литературе, соединение - аггастерон С 20,22-моноацетонид, относящееся к классу фитоэкдистероидов.

3. Установлено селективное - активирующее либо ингибирующее - воздействие экдистерона на активность пяти множественных форм фосфатазы и трех - малатдегидрогеназы жирового тела куколок дубового шелкопряда при общем увеличении суммарной активности ферментов. Введение ингибиторов транскрипционных и трансляционных процессов блокирует индукцию экдистероном двух форм кислой фосфатазы и новообразованной формы малатдегидрогеназы.

4. Показана индукция экдистероном активности ацetylхолинэстеразы жирового тела куколок дубового шелкопряда, обусловленная в основном биосинтезом фермента de novo. Индуцибельная новая форма фермента отличается по молекулярной массе, но не по кинетическим характеристикам. Блокирование процесса биосинтеза ингибиторами транскрипции и трансляции приводит к заметному уменьшению активности фермента и исчезновению его индуцибельной формы.

5. Обнаружена зависимость способности экистероидов индуцировать множественные формы ацетилхолинэстеразы от их структуры. В то время, как экистерон индуцирует синтез одной изоформы фермента /71 кДа /, а 2,3,22 - триацетат экистерона - двух новых изоформ 71 и 90 кДа, α -экизон, 2-дезоксид- α -экизон и 2-дезоксидэкистерон лишь увеличивает активность основной формы фермента 63 кДа.

6. С использованием методов планирования многофакторных экспериментов, в которых варьировали концентрацию препаратов, объем и кратность подкормки трихограммы экистероном и препаратами на основе экистероидов растений *Serratula coronata* L. *Serratula inermis* Gillb., найдены оптимальные условия повышения биотического потенциала и скорости роста энтомофага под влиянием фитогормонов. Выявлен наиболее перспективный препарат БТИ-4, содержащий экистерон, 2-дезоксид- и 26-оксидэкистерон, повышающий плодовитость трихограммы на 40% и увеличивающий ее репродуктивный период на 4-5 суток.

7. Применение препарата БТИ-4 при разведении маточной культуры трихограммы в условиях однократной подкормки препаратом БТИ-4 в концентрации $3 \cdot 10^{-5}\%$ способствовало двукратному увеличению доли зараженных яиц лабораторного хозяина - зерновой моли.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Kholodova Yu. D., Voznyan P. A., Miladera Ch., Ahmed I. The comparative estimation of colour reactions' sensitivity for the phytoecdysteroids analysis based on the absorption and fluorescence data // IV th Symposium on the "Analysis of steroids", april 24-26, 1990, Pecs Hungary.
2. Ахмед І., Вознян П. А., Кляшторна Г. В., Міладера Дж. К., Холодова Ю. Д. *Serratula tinctoria* L. і *S. wolffii* Andrae - перспективні джерела біологічно активних фітоекдистероїдів // Укр. ботан. журн. - 1990. - 47, № 4. - с. 31-34.
3. Тешлер М. П., Холодова Ю. Д., Міладера Дж. К. Влияние гормональных препаратов на биологические показатели *Trichogramma embryophagum* Htg // Трихограмма / биология, разведение, применение /: тез. докл. III Всесоюз. совещ. по трихограмме. Кишинев, 11-16 марта, 1991. - с. 76-78.
4. Саад М. Л., Міладера К. Дж., Холодова Ю. Д., Саатов З., Шатурский Я. П. Биостимуляторы на основе серпухи венценосной / *Serratula wolffii* Andrae // Тез. докл. I Международного конгресса "Биоконвер-

- сия органических отходов для получения биогумуса, биогаза, белковых веществ и охрана окружающей среды". Киев-Ивано-Франковск, 25-27 марта 1991.-с.72-73.
5. Кутузова Н.М., Филиппович Ю.Б., Холодова Ю.Д., Миладера К., Киндрук Н.Л., Корниен Г.В., Мороз Н.С. Экдистерон индуцирует активность множественных форм кислой фосфатазы и малатдегидрогеназы жирового тела куколок дубового шелкопряда // Укр. биохим. журн. -1991.-63, № 3.-с.41-45.
6. Холодова Ю.Д., Кляшторная Г.В., Данильченко М.Д., Ахмед И., Миладера К. Экологически безопасные регуляторы продуктивности насекомых на основе фитозкдистероидов из растений рода *Serratula* // Химизация и агроэкология. К., 1991.-с.9-17.
7. Миладера Дж.К., Саатов З., Холодова Ю.Д., Горюниц М.Б., Шашков А.С., Абубакиров Н.К. Фитозкдистероиды растений рода *Serratula* - аюгастерон С 20,22-моноацетонид из *S. wolffii* // Химия природ. соедин.-1992.-с.71-76.
8. Тешлер М.П., Холодова Ю.Д., Миладера Дж.К. Увеличение плодовитости *Trichogramma embryophagum* Htg. под влиянием гормональных препаратов // Докл. ВАСХНИЛ. Москва, 1992.- № 2.-с.11-16.
9. Тешлер М.П., Холодова Ю.Д., Миладера Дж.К., Гринберг Ш.М. Влияние дозы, объема и кратности подкормки гормональных препаратов на биологические показатели *Trichogramma embryophagum* Htg. // Сб. науч. тр.: "Экологические основы системы применения удобрений в севооборотах Лесостепи Украины"; отв. редактор М.Н. Городний, /в печати; план выпуска-1993 год /.

AB 27.718

AB 27.718