

Министерство образования и науки Российской Федерации

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)

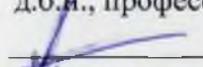
Биологический институт

Кафедра защиты растений

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП

д.б.н., профессор

 А.С. Бабенко

«10» июля 2016 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

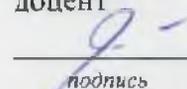
ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ  
НА ГЕМОЦИТЫ НАСЕКОМЫХ

по основной образовательной программе подготовки бакалавров  
направление подготовки  
35.03.04 - Агрономия

Кошкин Сергей Юрьевич

Руководитель ВКР к.б.н.,

доцент

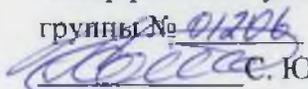
 Е. С. Гулик

подпись

«14» июля 2016 г.

Автор работы студент

группы № 01206

 С. Ю. Кошкин

подпись

## Содержание

Введение	4
1. Обзор литературы	6
1.1. Гемолимфа и ее функции	6
1.2. Плазма гемолимфы	7
1.3. Гемоциты насекомых	10
1.4. Энтмопатогенные грибы и их влияние на организм насекомых	16
2. Материалы и методы	22
2.1. Объект исследования	22
2.2. Изучение клеточного состава гемолимфы <i>Nauphoeta cinerea</i> при заражении некоторыми энтмопатогенными грибами	22
2.2.1. Постановка эксперимента	22
2.2.2. Приготовление и окрашивание препаратов	23
2.3. Определение влажности субстрата	23
2.4. Исследование картины гемолимфы <i>Nauphoeta cinerea</i> в динамике инфицирования различными изолятами гриба <i>Metarhizium anisopliae</i>	24
2.5. Микроскопирование препаратов	25
2.6. Подсчет гемоцитов	25
3. Результаты и обсуждение	26
3.1. Гемоциты интактных тараканов <i>Nauphoeta cinerea</i>	26
3.2. Гемоциты <i>Nauphoeta cinerea</i> при заражении некоторыми энтмопатогенными грибами	27

3.3. Влияние влажности субстрата на выживаемость <i>Nauphoeta cinerea</i>	32
3.4. Влияние заражения различными изолятами <i>Metarhizium anisopliae</i> на гемоциты <i>Nauphoeta cinerea</i>	33
Выводы	38
Список литературы	39

## Введение

Насекомые – самый многочисленный из всех классов многоклеточных животных, как по числу описанных видов, так и по количеству особей. Это обуславливает огромное разнообразие их биологии, значения в природе и жизни человека.

На популяционную динамику численности насекомых влияют различные патогены, среди которых выделяют энтомопатогенные грибы, с которыми насекомые тесно контактируют в биоценозах.

Энтомопатогенные грибы способны поражать сотни видов насекомых из разных отрядов. На основе ряда грибов созданы эффективные инсектицидные препараты.

При развитии микоза в организме насекомых активизируются системы клеточного (фагоцитоз, инкапсуляция, гранулообразование) и гуморального (антимикробные белки, коагуляция, фенолоксидазы) иммунитета. (Ярославцева, 2012).

Важнейшая роль в иммунитете насекомых принадлежит гемолимфе, состоящей из жидкой части – плазмы и гемоцитов. Динамика состава гемолимфы отражает степень интенсивности биохимических процессов в организме и используется для оценки физиологического состояния насекомых. Интенсивное изучение форменных элементов гемолимфы вредных чешуекрылых, некоторых прямокрылых и жесткокрылых насекомых, позволило в ряде случаев разработать или создать основу для качественных показателей прогноза массовых размножений ряда вредителей сельского и лесного хозяйства.

Таракановые служат модельным объектом для многих исследований в экспериментальной энтомологии (Элпидина и др., 2000; Иноземцев и др., 1998). Изучение гемолимфы тараканов в норме и при различных патологиях

является важным для понимания механизмов функционирования иммунной системы насекомых.

Цель данной работы – изучение влияния ряда энтомопатогенных грибов на клеточный состав гемолимфы насекомых на примере *Nauphoeta cinerea*.

Задачи исследования:

1. Исследование клеточного состава гемолимфы интактных *Nauphoeta cinerea*.
2. Исследование клеточного состава гемолимфы *Nauphoeta cinerea*, пораженных грибными инфекциями.
3. Изучение оптимальной влажности субстрата для выживания *Nauphoeta cinerea*.
4. Изучение влияния различных изолятов гриба *Metarhizium anisopliae* на клеточный состав гемолимфы *Nauphoeta cinerea*.

Работа выполнена на базе инсектария кафедры защиты растений. Выражаем благодарность к.б.н., доценту кафедры защиты растений Чикину Ю.А. за предоставленный материал энтомопатогенных грибов.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Гемолимфа и ее функции

Насекомые имеют незамкнутую кровеносную систему. Гемолимфа представляет собой единственную тканевую жидкость в теле насекомых. Подобно крови позвоночных она состоит из жидкого межклеточного вещества – плазмы – и находящихся в ней клеток гемоцитов. Но в отличие от крови позвоночных гемолимфа циркулирует не по замкнутым кровеносным сосудам, а в полости тела (гемоцеле). К тому же в ней нет клеток, снабженных гемоглобином или другим дыхательным пигментом.

Гемолимфа осуществляет транспорт питательных веществ от стенок кишечного канала ко всем органам. В выполнении этой трофической функции принимают участие гемоциты и химические соединения плазмы. Часть питательных веществ попадает из гемолимфы в клетки жирового тела. При голодании, диапаузе или во время линьки эти резервные продукты вновь переходят в гемолимфу и могут быть доставлены к местам их использования. У насекомых, развивающихся с полным превращением, те продукты, которые освобождаются при гистоллизе личиночных тканей, тоже транспортируются гемолимфой.

Вторая важная функция гемолимфы связана с ее участием в защите насекомых от инфекционных заболеваний и заражениями паразитами. В выполнении этой защитной функции участвуют белки плазмы, гемоциты, способные к фагоцитозу, и клетки, образующие гемоцитарные капсулы вокруг многоклеточных паразитов (Тыщенко, 1986).

Кровь является той средой, в которой протекают метаболические реакции. При циркуляции крови по телу насекомого вещества, содержащиеся в ней, подвергаются химическому превращению. Например, углевод трегалоза превращается в глюкозу.

Весь объем крови, заключенный в внутри тела насекомого, образует замкнутую гидравлическую систему, способную передавать давление с

одной части тела на другую. Этот в основе своей механический процесс используется насекомыми многообразно. Давление крови регулируется сокращениями груди или брюшка, или той и другой части тела вместе. Попеременное снижение и повышение давления крови, происходящее при дыхательных и мышечных движениях насекомого, вызывают опорожнение и наполнение трахейных воздушных мешков и карманов. Давление крови лежит в основе таких процессов, как растягивание покровов и расправление крыльев после линьки, а также разрыв оболочки яйца перед выходом личинки.

У большинства насекомых, по крайней мере, к некоторым клеткам не подходят трахеолы, и поэтому здесь невозможен непосредственный газообмен. По-видимому, такие клетки получают кислород из крови. Кровь играет вспомогательную роль в удалении из организма двуокиси углерода, основная часть которой диффундирует через ткани и выходит через кутикулу. В крови личинок некоторых видов *Chironomus* растворен гемоглобин, участвующий в процессе переноса кислорода. Связывание кислорода гемоглобином у *Chironomus*, конечно же, ни в коей мере не может сравниться по эффективности с функцией этого пигмента, содержащегося в эритроцитах млекопитающих (Росс, 1985).

## 1.2. Плазма гемолимфы

Составляя от 5 до 40% массы тела, гемолимфа насекомых наряду с жидкой плазмой включает в себя форменные элементы гемоциты. Обычно гемолимфа бесцветная, реже – желтая или зеленая. Ее реакция близка к нейтральной (рН 6-7), но осмотическое давление заметно выше, чем у гемолимфы млекопитающих. Основными осмотически активными веществами у насекомых являются аминокислоты и другие органические соединения (Захваткин, 2001).

В плазму входит вода с растворенными в ней газами ( $O_2$  и  $CO_2$ ) и диссоциированными неорганическими ионами (катионы:  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ;

анионы:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), а также разнообразные органические вещества: углеводы, органические кислоты, глицерин, липиды, аминокислоты, дипептиды, олигопептиды, белки и пигменты. Высокая концентрация аминокислот, особенно глутамина и глутаминовой кислоты, определяется их ролью в осморегуляции. Вместе с тем они используются для синтеза белков и как резервы азотистых соединений для синтеза кутикулы (тирозина, триптофана). Поступая в гемолимфу из жирового тела, пищи и гидролизованных при метаморфозе белков тканей тела, они обычно сохраняются в виде пептидов. В гемолимфе присутствуют также белки, и их концентрация закономерно изменяется при линьках и развитии насекомого. Как субстрат морфогенетических объектов и источник энергии они участвуют в транспортировке углеводов и жиров в форме гликопротеидов и липопротеидов. Некоторые плазменные белки выполняют ферментативную функцию: одни из них участвуют в синтезе мочевой кислоты, другие проявляют эстеразную активность и обеспечивают внеклеточный гидролиз сложных эфиров.

Из углеводов гемолимфы не менее 80% приходится на долю трегалозы. Она синтезируется из двух молекул глюкозы в клетках жирового тела и расщепляется вновь ферментом трегалазой в метаболически активных органах. При понижении температуры из гликогена жирового тела синтезируется глицерин. Выполняя роль антифриза, он предотвращает замерзание гемолимфы зимующих насекомых. Среди липидов, присутствующих в гемолимфе обычно в виде липопротеидов, основная масса представлена сложными эфирами глицерина и жирных кислот. Последние служат источником энергии, и если трегалоза и гликоген расходуются уже в первую минуту полета, то, например, жирные кислоты жирового тела у пустынной саранчи *Schitocerca gregaria* Forsk. обеспечивают непрерывный лёт в течение 5 часов.

Липиды поступают в гемолимфу, главным образом, из кишечника и жирового тела. Наиболее значительную часть липидной фракции гемолимфы

составляют глицериды, т.е. сложные эфиры глицерина и жирных кислот. У большинства насекомых липиды накапливаются в жировом теле в виде триглицеридов (жиров), а гемолимфа транспортирует, главным образом, диглицериды. Транспортная функция диглицеридов оправдывает высокое их содержание в плазме гемолимфы. Однако у клопа-солдатика *Pyrrhocoris apterus* и резервные липиды жирового тела, и транспортные липиды гемолимфы представлены триглицеридами.

Жирные кислоты, которые входят в состав глицеридов гемолимфы, потребляются мышцами и другими тканями. Крыловая мускулатура прямокрылых использует липиды в качестве основных источников энергии. Диглицериды гемолимфы обеспечивают бесперебойное снабжение мышц жирными кислотами во время полета саранчовых. Полагают, однако, что у совки *Prodenia eridania* гемолимфа транспортирует к крыловым мышцам не диглицериды, а свободные жирные кислоты, освобождаемые в результате расщепления триглицеридов клетками жирового тела (Захваткин, 2001).

Свертываемость крови у разных насекомых неодинакова. У многих насекомых кровь вообще не свертывается, и раны обычно закрываются пробками, состоящими из специализированных клеток крови (прежде всего плазматочитов и подоцитов). У других насекомых кровь свертывается очень хорошо; этому способствуют вещества, высвобождаемые специальными клетками крови.

При повреждении покровов у многих насекомых гемолимфа, вытекающая наружу, свертывается и образует кровяной сгусток. В свертывании гемолимфы принимают участие гемоциты и плазма. Этот процесс протекает в два этапа: сначала происходит *коагуляция* плазмы, а затем *агглютинация* (склеивание) гемоцитов.

Некоторые цистоциты, названные *коагулоцитами*, способны выделять *коагулины* — вещества, вызывающие свертывание гемолимфы. Цитоплазма коагулоцитов заполнена гранулами, исчезающими вскоре после начала

коагуляции. По-видимому, содержимое этих гранул расходуется на образование коагулинов.

У прямокрылых и тараканов под фазово-контрастным микроскопом можно увидеть, как вокруг коагулоцитов образуется ореол загустевшей плазмы. Под электронным микроскопом коагулировавшая плазма приобретает вид сплошной губчатой массы. Иная картина наблюдается при свертывании гемолимфы у гусениц. В этом случае коагулоциты образуют длинные тонкие тяжи, вокруг которых и происходит коагуляция плазмы. В сетке переплетающихся цитоплазматических тяжей застревают другие гемоциты, пассивно вовлекаясь в формирование кровяного сгустка. У большинства перепончатокрылых свертывание гемолимфы осуществляется одновременно двумя путями: плазма загустевает как вокруг коагулоцитов, так и в переплетениях цитоплазматических тяжей (Тыщенко, 1986).

### 1.3. Гемоциты насекомых

У большинства насекомых в  $1 \text{ мм}^3$  гемолимфы содержится от 10000 до 100000 клеток.

Гемоциты насекомых представляют собой снабженные ядрами мезодермальные клетки, циркулирующие в гемолимфе (Тыщенко, 1986).

В плазме они находятся во взвешенном состоянии или иногда непрочны прикрепляются к клеткам других тканей (Росс и др., 1985).

Предполагается, что все морфологические типы гемоцитов дифференцируются из одного источника — прогемоцитов. В культурах тканей мелкие делящиеся прогемоциты могут превращаться в крупные запасующие клетки типа гранулоцитов и адипогемоцитов. *Кроветворные органы насекомых*, представленные островками клеток в разных участках тела, формируются, главным образом, из прогемоцитов.

Благодаря способности к трансформациям клетки гемолимфы, находящиеся в разных морфологических состояниях, могут выполнять разные функции. Обычно каждый тип гемоцитов накапливается в

максимальном количестве на определенных этапах жизненного цикла. Поэтому любая стадия развития характеризуется специфичной для нее *гемограммой*, отражающей процентное соотношение разных типов гемоцитов. Гемограмма крайне чувствительна к физиологическим изменениям в организме насекомого. Она может использоваться для оценки «упитанности» насекомых или для ранней диагностики заболеваний, зараженности паразитами и отравления инсектицидами. Указывают и на возможность использования гемограмм в систематике насекомых.

Плазматоциты, гранулоциты, сфероциты и адипогемоциты могут переходить в амeboидное состояние и выполнять фагоцитарные функции. Они активно захватывают чужеродные тела и микроорганизмы, проникающие в тело насекомых. При полном метаморфозе амeboидные гемоциты участвуют и в гистоллизе личиночных органов, разрушающихся на куколочной стадии. У куколок мухи *Sarcophaga bullata* способные к фагоцитозу гемоциты являются одной из модификаций гранулоцитов. Во время формирования пупария у них происходят многократные митозы без последующего деления самих клеток. В результате образуются многоядерные гемоцитарные массы, которые активно захватывают и переваривают фрагменты разрушаемых личиночных тканей.

Сфероциты, адипогемоциты и некоторые другие типы гемоцитов принимают участие в процессах накопления и расходования питательных веществ. У гусениц совки *Prodenia eridania* гранулы гликогена обнаруживаются в клетках гемолимфы, начиная с третьего возраста. По мере роста гусениц содержание гликогена в гемоцитах увеличивается и достигает максимума перед окукливанием. Гликоген расходуется куколками и отсутствует в гемоцитах бабочек. Жировые включения появляются в клетках гемолимфы у коконирующихся гусениц и полностью исчезают во время развития куколок. По-видимому, гемоциты не синтезируют жиры, а получают их от клеток жирового тела. На куколочной стадии гемоциты снабжают питательным материалом формирующиеся имагинальные органы.

У куколок мух адипогемоциты образуют тонкие цитоплазматические отростки, которые вступают в связь с развивающимися мышечными и эпидермальными клетками. По таким цитоплазматическим отросткам питательные вещества передаются от гемоцитов к другим клеткам.

Клетки гемолимфы играют важную роль в обмене тирозина и его производных. Сфероциты и эноцитоиды содержат профенолазу — неактивный предшественник фермента тирозиназы, обеспечивающего превращение тирозина в ДОФА. Под влиянием некоторых активаторов и при повреждении покровов профенолаза переходит в активное состояние, в гемолимфе накапливается ДОФА, из которого образуются темные пигменты меланины. Эти реакции объясняют быстрое потемнение гемолимфы на открытом воздухе: атмосферный кислород активирует профенолазу и окисляет ДОФА до хинонов, образующих полимерные молекулы меланинов (Тыщенко, 1986).

Существует несколько классификаций гемоцитов, но ни одна из них не применима ко всем видам насекомых. В отличие от крови млекопитающих, гемолимфа насекомых содержит различные стадии развития гемоцитов, переходные и зрелые формы (Захваткин, 2001).

Большинство исследователей придерживаются классификации Chapman, Jones, 1985 (Росс и др., 1985), в соответствии с которой выделяют девять типов гемоцитов (рис. 1): основные и дополнительные клетки.

Все насекомые обладают тремя основными типами гемоцитов.

Прогемоциты (рис. 1. А) – округлые или слегка вытянутые клетки с относительно большим ядром и интенсивно базофильной цитоплазмой. Морфологически они наиболее четко выделяются среди всех других типов клеток крови. В них наиболее часто наблюдаются митозы. Слегка вытянутые, почти веретовидные клетки представляют собой, вероятно, промежуточные формы между прогемоцитами и плазматоцитами.

Плазматоциты (рис. 1. Б) – наиболее многочисленные клетки. Они разнообразны по размерам как самих клеток, так и их ядер и по окраске.

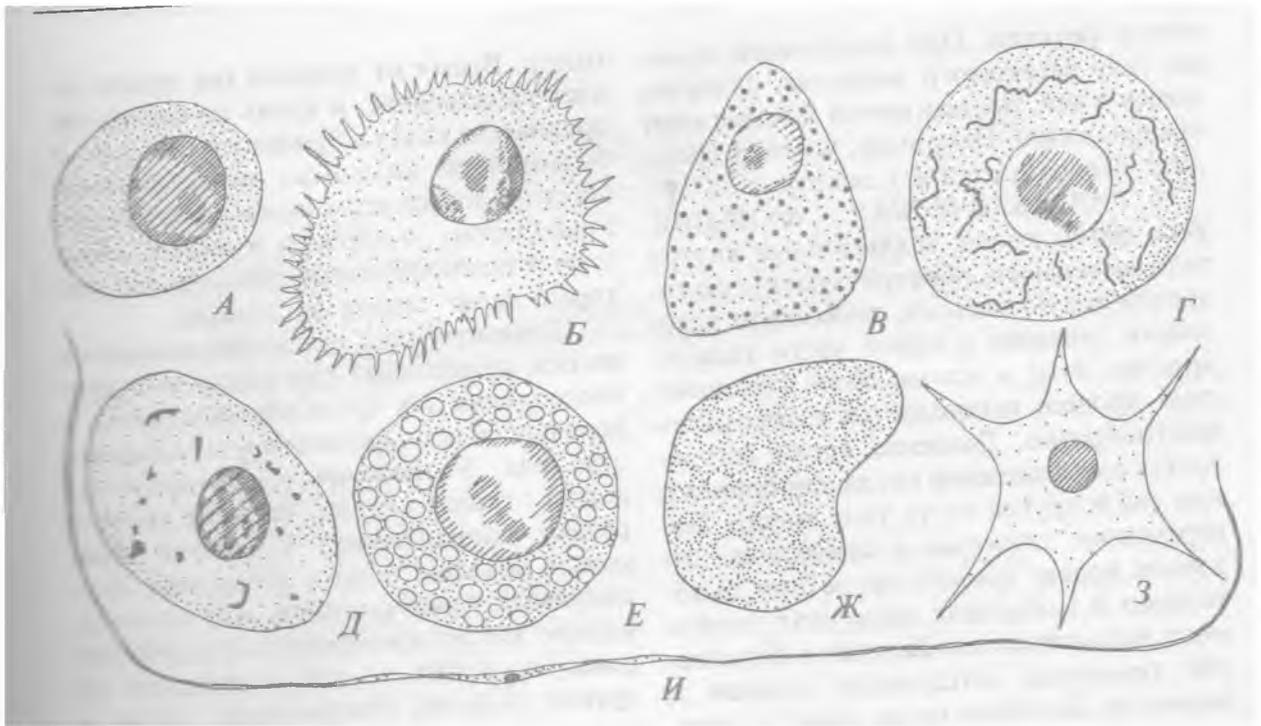


Рис. 1. Типы гемоцитов насекомых (Charman, Jones, 1985) А – прогемоцит; Б – плазматоцит; В – гранулоцит; Г – энцит; Д – цистоцит; Е – сферическая клетка; Ж – адипогемоцит; З – подоцит; И – червеобразная клетка.

Цитоплазма плазматоцитов иногда бывает сильно вакуолизирована и обычно слабо базофильна. Форма этих клеток чрезвычайно разнообразна и очень редко бывает правильной, большей частью они имеют множество отростков, выпячиваний и т.д.

Гранулоциты (рис. 1. В) по форме и размерам очень сходны с плазматоцитами, но отличаются наличием в цитоплазме различного рода гранул. Первый тип гранул – мелкие, либо равномерно рассеяны по всей цитоплазме, либо концентрирующиеся около ядра. Гранулы другого типа хорошо видны при малых увеличениях микроскопа и, вероятно, представляют собой промежуточные формы между гранулоцитами и сфероцитами.

Каждый тип дополнительных клеток обнаруживается не у всех, а только у части видов насекомых. Всего насчитывается 6 таких типов.

Сфероциты, или клетки со сферами (рис. 1. Е), резко выделяются среди остальных типов клеток. Их цитоплазма заполнена овальными, почти

одинаковыми по размерами включениями, которые хорошо окрашиваются всеми красителями. У тараканов эти включения представлены кислыми мукополисахаридами. Клетки этого типа хорошо отличаются от других благодаря их темной окраске. Ядро небольшое, базофильное. Форма сфероцитов, разнообразна, но они не имеют отростков, как плазматоциты и гранулоциты, а обычно округлые или овальные. Клетки со сферами, вероятно, могут образовываться из гранулоцитов, в которых начинают накапливаться гранулы такого же типа, как у сфероцитов. Сферические клетки могут рассматриваться, как высокоспециализированный тип гранулоцитов.

Адипогемоциты (рис. 1. Ж), или клетки с жировыми включениями, отличаются наличием в цитоплазме разного размера вакуолей с жировыми включениями. Адипогемоциты очень разнообразны по форме и размерам и могут быть похожи на вакуолизированные плазматоциты, но жировые вакуоли отличаются от вакуолей плазматоцитов, во-первых, более крупными размерами, во-вторых, способностью сильнее преломлять свет.

Цистоциты (рис. 1. Д) – разнообразные по форме базофильные клетки, снаружи покрытые гиалиновым слоем жидкой цитоплазмы. Ядра округлые. Внутри клеток часто находятся гранулы или капельно-жидкие запасы ацидофильных питательных веществ. На фиксированных мазках крови цистоциты лишь с большим трудом можно отличить от гранулоцитов.

Эноциты (рис. 1. Г) – обычно крупные базофильные клетки с мелкозернистой цитоплазмой. Внутриклеточные включения присутствуют всегда, они могут иметь вид пластинчатых или игольчатых кристаллов, которые находятся не только в цитоплазме, но и в ядре. Эноциты обнаруживаются преимущественно у насекомых, развивающихся с полным превращением, но также у тлей, у клопа *Rhodnius prolixus* и у ряда других. Эноциты тесно связаны с покровами насекомых. По всей вероятности, они продуцируют вещества, необходимые для формирования кутикулинового и воскового слоя эпикутикулы. Отличаются тем, что ядра окрашиваются почти

одинаково с цитоплазмой и поэтому плохо заметны. Клетки эти не имеют отростков, но могут быть самой разнообразной формы.

Подоциты (рис. 1. 3) – очень большие, уплощенные клетки с длинными цитоплазматическими отростками. Эти отростки похожи на псевдоподии, но, по-видимому, не изменяют свою форму и не служат для передвижения.

Червеобразные клетки (рис. 1. И) – это наиболее специализированный и необычный тип гемоцитов: они имеют вид сильно удлинённых, почти нитевидных плазмоцитов (Тыщенко, 1976).

Так, у личинок третьего возраста *Anastrepha obliqua* обнаружены прогемоциты, плазматоциты, гранулоциты, адипогемоциты, сферулоциты и энциты. Прогемоциты, плазматоциты и гранулоциты наиболее многочисленные клетки в гемолимфе *A. obliqua* (Silva, J. E. B., 2002).

Следует подчеркнуть, что гемоциты всех типов чрезвычайно разнообразны по форме, окраске клеток и ядер и другим особенностям. Поэтому не всегда просто определить, к какому типу относится та или иная клетка. Прогемоциты, вероятно, служат исходной формой для плазматоцитов и реже – для гранулоцитов с мелкими гранулами. Плазматоциты могут послужить источником образования гранулоцитов, сфероцитов, адипогемоцитов. Между всеми указанными типами существует множество переходных форм. Особенно трудно отделить сфероцит от гранулоцита с крупными гранулами. Помогает разобраться в этом изучение всех типов гемоцитов в разные периоды развития насекомого.

Благодаря способности к трансформациям клетки гемолимфы, находящиеся в разных морфологических состояниях могут выполнять разные функции. Обычно каждый тип гемоцитов накапливается в максимальном количестве на определенных этапах жизненного цикла. Поэтому любая стадия развития характеризуется специфичной для нее гемограммой, отражающей процентное соотношение разных типов гемоцитов. Гемограмма крайне чувствительна к физиологическим изменениям в организме насекомого. Она может использоваться для оценки «упитанности»

насекомых или для ранней диагностики заболеваний, зараженности паразитами и отравления инсектицидами. Указывают и на возможность использования гемограмм в систематике насекомых (Тыщенко, 1986).

Н.И.Кочетова (1978) исследовала форменные элементы гемолимфы в постэмбриональном развитии таракана *Nauphoeta cinerea*. Основываясь на классификации Charman (1969), Кочетова Н.И. (1978) все отмеченные типы гемоцитов *N. cinerea* условно разделила на две группы: а) клетки, составляющие основную массу гемоцитов, б) клетки, встречающиеся единично. Гемоциты первой группы наиболее вариабельны: по размерам, по форме и другим особенностям. К ней автор относит следующие типы клеток: прогемоциты, плазматоциты, сфероциты, гранулоциты.

Перечисленные четыре типа клеток составляют основную массу гемоцитов *N. cinerea*, причем наиболее многочисленны плазматоциты, а все остальные встречаются в приблизительно в одинаковых количествах.

К единично встречающимся клеткам Н.И.Кочетова относит адипогемоциты и эноцитоиды (Кочетова, 1978).

#### 1.4. Энтомопатогенные грибы и их влияние на организм насекомых

Грибные патогены являются родоначальниками микробиологических средств борьбы: именно изучением и применением препарата из гриба зеленой мускардины И.И. Мечников (1872) положил начало развитию этой новой области защиты растений. Важными вопросами при создании грибных препаратов являются предварительное изучение биологии, экологии, вирулентности патогенов, их способности выживать в окружающей среде и роль в регуляции численности вредных членистоногих (Мжаванадзе, 1985).

Идея использования бактериальных методов борьбы с насекомыми была выдвинута знаменитым русским ученым И. И. Мечниковым (1879) в связи с проводившимися им исследованиями по борьбе с хлебным жуком, предпринятыми по просьбе Одесского земства. Мечников открыл патогенные для хлебного жука бактерию *Bacillus salutarium* и гриб *Metarhizium anisopliae*

и разработал метод культивирования этого гриба на пивных дрожжах для практического применения в борьбе с хлебным жуком. Эта идея нашла себе энергичных последователей в лице других русских ученых – И. М. Красильщика, Л. С. Ценковского.

Грибы, поражающие насекомых, это условная экологическая группа, выделяемая на основании одного признака – обитания внутри или на поверхности насекомого. В систематическом отношении к ней относятся представители различных систематических таксонов – фикомицетов, аскомицетов, а также многих несовершенных грибов.

Для этой группы грибов в литературе предлагается ряд названий – энтомогенные, энтофильные, энтомофильные, энтомофитные, энтомофагные и т.п. О. Фассатиова (Fassatiova, 1965) предложила признавать три категории: 1) энтомофитные – все грибы, которые каким-либо образом связаны с насекомыми в качестве субстрата; 2) энтомофагные (энтомопатогенные) – грибы, примерно паразитирующие и непременно вызывающие болезнь и смерть; 3) энтофильные – сапрофитные грибы, которые развиваются на мертвых насекомых. Штейнхауз (Steinhaus, 1950, цит. по Евлаховой, 1974) применяет для этой группы грибов обобщающие названия – энтомогенные или энтомофильные. Термин «энтомогенный» в переводе означает «происходящий от насекомого» и не содержит никаких указаний относительно самих микроорганизмов и их взаимоотношений с насекомыми. «Энтомофитный» - почти синоним термина «энтомогенный», его можно применять для обозначения любых взаимоотношений между различными микроорганизмами растительного происхождения (бактериями, актиномицетами, грибами) и насекомыми, но нельзя применять к простейшим. Термин «энтомофагный» означает «насекомоядный» и применяется не к микроорганизмам растительного происхождения, а к насекомым или другим животным, поедающим или поражающим насекомых. Наиболее широким и обобщающим является термин «энтомофильный» (синоним его – энтофильный), который включает в себя способность гриба

(или другого микроорганизма) жить на поверхности или внутри насекомого, независимо от того, является он болезнетворным, симбионтом или просто сапрофитом. Термин «энтомофильный» может применяться для обозначения взаимоотношений не только между насекомыми и растительными микроорганизмами, но и между насекомыми и простейшими или между насекомыми и нематодами (Штейнхауз, 1952).

Все типичные паразитические грибы выделяют большинство ферментов, необходимых для растворения кутикулы насекомых. Проникновение некоторых энтомофторовых грибов, не имеющих внеклеточной хитиназы, через кутикулу насекомых этот автор объясняет тем, что твердость покровов определяется уплотнением протеина кутикулы, но не наличием хитина (Евлахова, 1974).

При токсигенном типе микоза, вызванном *Metarhizium robertsii*, происходит быстрое подавление клеточного иммунитета хозяев и выраженный ответ со стороны гуморальной и детоксицирующей систем по сравнению с биотрофным типом микоза. При этом у токсигенных штаммов проявляется специализация, связанная с возможностью конидиеобразования только на определенных группах насекомых. Токсигенная стратегия сопряжена с более высокой приспособленностью грибов к сапротрофному развитию (Крюков, 2014).

В гемолимфе зараженных *M. anisopliae* насекомых в фильтрате культуральной жидкости этого гриба обнаружили активные токсины, которые были детально исследованы с химической стороны. Кодайра выделил два токсина, названные им деструксин А ( $C_{29}H_{47}O_7N_5$ ), летальный для тутового шелкопряда в дозе 0,28 мкг на 1 г веса тела (Евлахова, 1974).

Наиболее изучаемыми токсинами в настоящее время являются деструксины - токсины, впервые выделенные из грибов рода *Metarhizium*. В настоящее время насчитывается около 38 типов деструксинов или их аналогов. Деструксины (А, В, Е) обладают выраженным инсектицидным действием. У насекомых при инъекциях деструксинов возникает паралич или

тремор. Кроме того, деструксины обладают иммуносупрессивным действием за счет нарушения функций цитоскелета гемоцитов и, как следствие, подавления процессов клеточного иммунитета (Дубовский, 2015).

Влияние патогенных грибов на ткани, органы и на физиологические функции насекомых и клещей рассмотрено в значительном количестве работ отечественных и зарубежных авторов. Так, например, у *Periplaneta* свертывание крови состоит в образовании клеточного «сгустка» из гемоцитов; клетки гемолимфы теряют присущую им дискоидальную и веретенообразную форму, округляются, начинают преломлять свет, затем выпускают тонкие отростки и, наконец, дегенерируют и слипаются вместе (Шовен, 1953). Описаны различные нарушения: изменения состава, морфологии форменных элементов и реакции гемолимфы, снижение плодовитости, потеря веса и нарушение дыхания, а также функций эндокринной системы (Евлахова, 1974). Исследования М. Ajamhassani et al. (2013) показали увеличение общего числа гемоцитов, а также количества плазматоцитов и гранулоцитов после инъекции спор *Beauveria bassiana* личинкам 4-го возраста *Hyphantria cunea*.

Исследования показали, что под влиянием деятельности паразитных грибов происходят глубокие функциональные нарушения, а также изменения в тканях и органах пораженных хозяев. Например, при энтомофторозе тело насекомых еще при жизни заполнено мицелиальными элементами и продуктами жизнедеятельности энтомофторовых грибов. При мускардинозе и кордицепсмикозе тело насекомых вскоре после их гибели превращается в склероций (Евлахова, 1974).

Известно, что некоторые микроорганизмы обладают резко выраженным тропизмом в отношении жировой ткани. Так, например, энтомофторовые грибы в первую очередь разрушают жировое тело насекомых. Как отмечает Бенз, разрушение жирового тела в личинках препятствует линьке и особенно метаморфозу; во взрослой фазе насекомых это тормозит образование гамет (Евлахова, 1974).

Энтомопатогенные грибы представляют большой интерес как продуценты ферментов, токсинов и других биологически активных веществ (Евлахова, 1974).

Специфичность действия в отношении насекомых и нетоксичность или слабая токсичность для теплокровных позволяют считать возможным использование токсинов энтомопатогенных грибов в качестве инсектицидов.

Грибы способны становиться членами биоценоза, в который они внесены, и самостоятельно размножаться в нем.

Являясь в большинстве широко специализированными паразитными, грибы охватывают сравнительно большой круг насекомых-хозяев, что позволяет им сохраняться в природе в отсутствие основного хозяина.

Грибы способны заражать насекомых различными путями – через покровы, перорально и через отверстия в теле (Евлахова, 1974).

Изучены иммунодепрессивная и инсектицидная активность энтомопатогенных грибов *Cordyceps militaris* на личинках колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*. При пероральном заражении было обнаружено снижение выживаемости, снижение общего количества гемоцитов, увеличение активности фенолоксидаз в гемолимфе и снижение активности ферментов в кутикуле (Kryukov, 2013).

Значительную роль в проницаемости наружных покровов насекомых, помимо структуры играют физиологическое состояние насекомых, плотность хитина и наличие ингибирующих и стимулирующих грибы компонентов эпикутикулы некоторых видов насекомых.

Значительная часть описанных энтомопатогенных грибов поддается культивированию на питательных средах и может быть приготовлена в виде биопрепаратов.

Грибы поражают сравнительно небольшое количество полезных насекомых, что позволяет широко использовать их в практике сельского хозяйства (Евлахова, 1974). В отличие от других микробиологических средств, препараты на основе грибов принципиально отличаются от других

микробиологических средств наличием контактного и перорального действия, что позволяет их использовать против сосущих вредителей (тлей, белокрылок, кокцид клопов, клещей и др.) и почвообитающих насекомых. Высокие результаты дает применение грибов в закрытом грунте, где создаются благоприятные для них гигротермические условия. Однако потенциал энтомопатогенных аско- и дейтеромицетов использован недостаточно – в прикладных биотехнологических работах по созданию микроинсектицидов пока задействованы считанные виды из родов *Beauveria*, *Tolypocladium*, *Metarhizium*, *Poecilomyces*, *Nomuraea*, *Verticillium*, *Hirsutella*, *Culicinomyces*, *Aschersonia* (Патогены насекомых..., 2001).

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования

Влияние энтомопатогенных грибов на гемолимфу изучали на лабораторной культуре *Nauphoeta cinerea*, относящегося к подотряду – *Blattaria*; семейству – *Blaberidae*. В эксперименте использовали личинок последнего возраста или взрослых тараканов.

### 2.2. Изучение клеточного состава гемолимфы *Nauphoeta cinerea* при заражении некоторыми энтомопатогенными грибами

Исследовали шесть различных видов энтомопатогенных грибов: *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Metarhizium anisopliae*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Scopulariopsis fuscum*, выращенных на питательной среде.

#### 2.2.1. Постановка эксперимента

В течение четырех недель тараканов содержали по 3 экземпляра в 9 пластиковых контейнерах объемом 250 мл, в которых находились субстраты с различными грибами, помещенными в маленькие пластиковые чашки Петри (таблица 1).

Таблица 1

Список грибов, использованных в опытах

№ контейнера	Виды грибов	Время нахождения в коллекции и количество пересевов
1	<i>Beauveria bassiana</i>	с 2000 г. (более 7)
2	<i>Beauveria bassiana</i>	с 2000 г. (более 7)
3	<i>Paecilomyces farinosus</i>	с 2002 г. (более 5)
4	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	с 2002 г. (более 5)
5	<i>Metarhizium anisopliae</i>	с 2010 г. (3)
6	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	с 2000 г. (более 7)
7	<i>Scopulariopsis fuscum</i>	с 2001 г. (более 6)
8	<i>Metarhizium anisopliae</i>	с 2002 г. (более 5)
9	<i>Metarhizium anisopliae</i>	с 2010 г. (более 4)

Энтомопатогенные грибы являются контактными ядами, поэтому изучению способов их проникновения насекомых уделяется большое внимание.

Ежедневно контейнеры смачивали водой.

### 2.2.2. Приготовление и окрашивание препаратов

Через 26-28 суток после начала эксперимента у *Nauphoeta cinerea* брали гемолимфу для приготовления мазков. Мазки гемолимфы делали на предметных стеклах, предварительно обезжиренных смесью Никифорова (равные части 96% этанола и диэтилового эфира). Тараканов, у которых планировалось взятие гемолимфы, помещали в холодильную камеру на 30 минут для обездвиживания. Затем отрезали усик таракана, либо сегмент конечности, либо, если из двух вышеперечисленных источников гемолимфа не выделялась, отсекали голову. Небольшое количество выделившейся гемолимфы капали на предметное стекло и быстро с помощью специального стекла для приготовления мазков крови (поставив его под углом 45°) делали равномерный мазок. Предметные стекла с мазками гемолимфы помещали на 30 минут в 96% этанол для фиксации гемоцитов. Окрашивание мазков проводили по Романовскому – Гимзе. Готовый жидкий краситель перед окрашиванием мазков разводили из расчета одна часть красителя к десяти частям дистиллированной воды. Мазки окрашивали в течение 30 минут при комнатной температуре. После окрашивания мазки промывали в проточной холодной воде и высушивали на воздухе.

### 2.3. Определение влажности субстрата

Для определения оптимальной влажности субстрата для выживаемости таракана *N. cinerea*, исследовали три варианта влажности: 34%, 87,7% и 156,4%.

Влажность субстрата определяли согласно ГОСТ 28268 – 89 «Почвы. Методы определения влажности, максимальной гигроскопической влажности и влажности устойчивого завядания растений».

В ходе опыта в качестве субстрата использовали кленовые «крылатки». Данный вид субстрата использовали Ю.А.Чикин, С.В.Лукьянцев при исследовании в лабораторных условиях распространения условно-патогенных грибов синантропными тараканами (Чикин, Лукьянцев, 2008). Определение влажности проводили после увлажнения и автоклавирования субстрата в колбах ёмкостью 250 мл. Затем растительный субстрат помещали в чистые пластиковые контейнеры объёмом 350 мл, куда подсаживали *Nauphoeta cinerea* по 10 особей в контейнер. Ежедневно контейнеры взвешивали и добавляли некоторое количество воды для поддержания первоначальной влажности внутри контейнера. Также визуально оценивали состояние насекомых, отмечая отклонения в их поведении.

#### 2.4. Исследование картины гемолимфы *Nauphoeta cinerea* в динамике инфицирования различными изолятами гриба *M. anisopliae*

Использовали четыре изолята гриба *M. anisopliae* (табл. 2). Изолят 2 был любезно предоставлен Б.А.Борисовым. Изоляты 1, 3 и 4 были выделены из тараканов *Nauphoeta cinerea*, содержащихся в инсектарии каф. защиты растений Биологического института ТГУ. Изолят 1 был выделен в 2010 г. Изоляты 3 и 4 были выделены из насекомых, зараженных изолятом 1.

Таблица 2

#### Изоляты *M.anisopliae*, использованные в опыте

№ изолята п/п	Происхождение изолятов
1	16.09.2010
2	2002, был получен от Б. Борисова (Москва)
3	Реизолят из посева 30.12.12
4	Реизолят из посева 07.01.2015

Кленовые «крылатки», зараженные четырьмя изолятами *M. anisopliae*, помещали в 4 пластиковых контейнера объемом 350 мл. В каждый контейнер запускали по 10 тараканов *N. cinerea*. Контролем служили интактные тараканы, помещенные в один пластиковый контейнер объемом 350 мл со стерильным незараженным субстратом.

Гемолимфу отбирали для приготовления мазков, как описано в п.2.2.2 через 2, 4, 6, 8 и 10 суток после заражения насекомых.

#### 2.5. Микроскопирование препаратов

Мазки просматривали и исследовали с помощью микроскопа ZEISS AXIO Lab. A1. Фотографирование проводили при помощи встроенного аппарата ZEISS AxioCam ERc 5s.

#### 2.6. Подсчет гемоцитов

На препаратах выбирали 3-5 полей, в которых подсчитывали количество различных типов гемоцитов и выражали в процентах.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Гемоциты интактных тараканов *Nauphoeta cinerea*

Наши исследования показали, что в гемолимфе тараканов *Nauphoeta cinerea* встречаются пять типов гемоцитов: прогемоциты, плазматоциты, гранулоциты, сфероциты и адипогемоциты. Прогемоциты – небольшие, округлые клетки с крупным ядром и базофильной цитоплазмой (рис. 2А). Плазматоциты – агранулярные или с небольшим количеством гранул клетки, овальной или веретеновидной формы. Ядро расположено в центре или на периферии клетки (рис. 2Б, В). Гранулоциты – овальные клетки с округлым ядром, расположенным в центре. В ацидофильной цитоплазме локализовано большое количество гранул (рис. 2Д). Сфероциты – большие, округлые или овальные клетки, имеющие в цитоплазме сферические, бесцветные включения (сферулы) (рис. 2Г). Адипогемоциты – клетки непостоянной формы с большим количеством каплевидных или грануловидных включений (рис. 2Е).

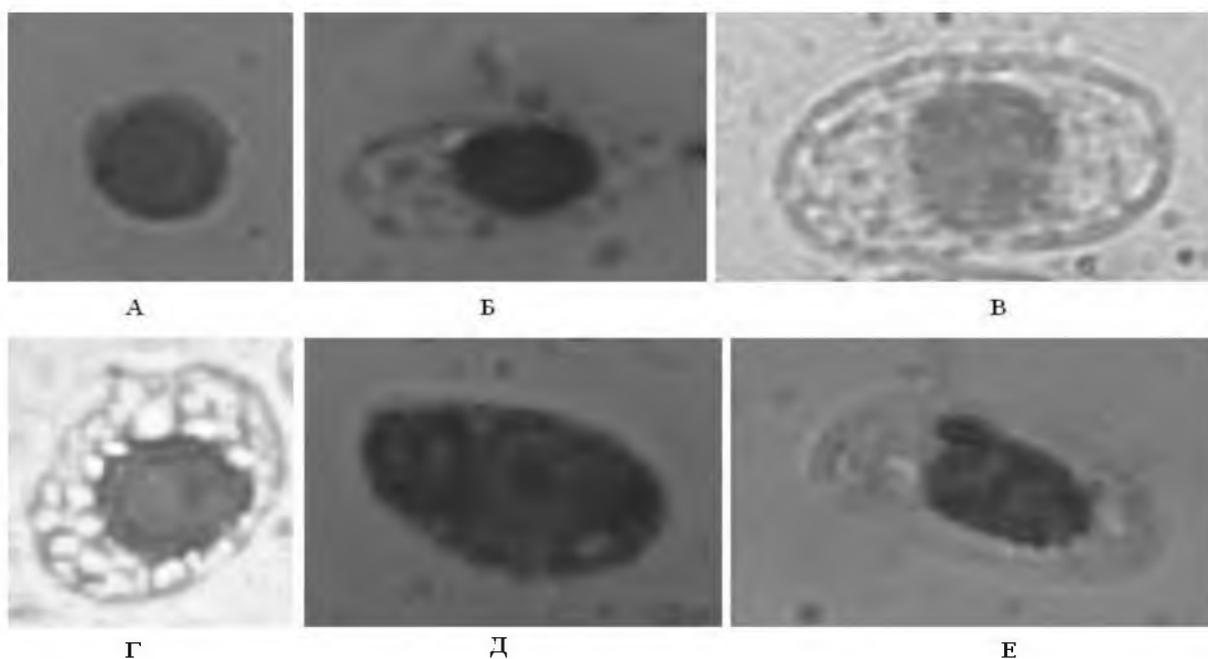


Рис. 2. Типы гемоцитов интактных тараканов *N. Cinerea*. А – прогемоцит; Б, В – плазматоциты; Г – сфероцит; Д – гранулоцит; Е – адипогемоцит.

Наиболее типичными клетками у интактных тараканов *N. cinerea* являются – плазматоциты и гранулоциты, количество которых составило 50% и 22,2% соответственно (рис. 3). Реже встречаются прогемоциты и сфероциты (рис.3). В единичных случаях – адипогемоциты.

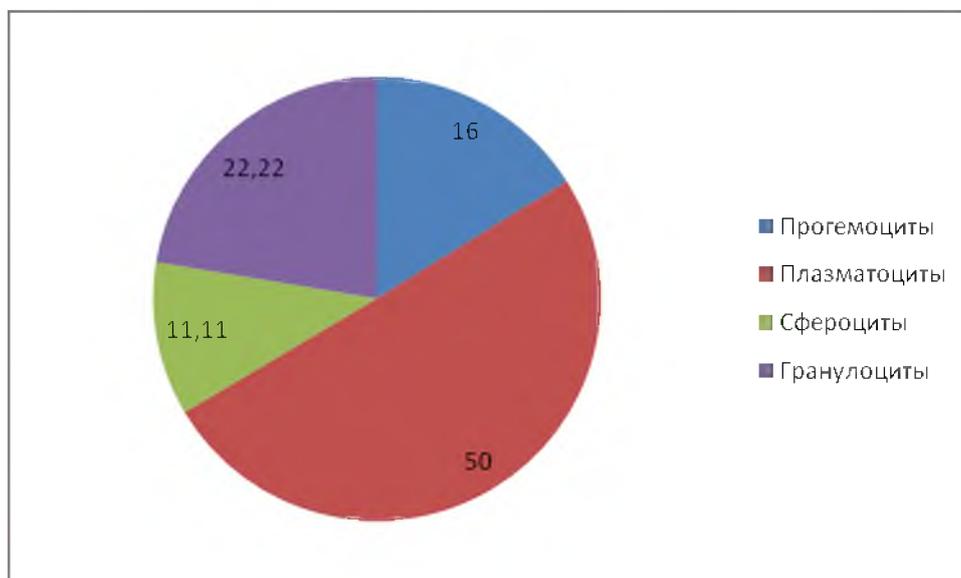


Рис.3. Соотношение (%) гемоцитов интактных тараканов *Nauphoeta cinerea*

Полученные результаты частично согласуются с работой Кочетовой Н.И. (1978), которая указывает на наличие четырех основных типов гемоцитов в гемолимфе *Nauphoeta cinerea*: прогемоциты, плазматоциты, гранулоциты и сфероциты. Среди единично встречающихся клеток автор отмечает адипогемоциты и энцитойды. Незначительные отличия могут быть вызваны тем, что при взятии мазка гемолимфы тараканы находились в разных жизненных фазах или возрастах.

### 3.2. Гемоциты *Nauphoeta cinerea* при заражении некоторыми энтомопатогенными грибами

Гемоциты тараканов, зараженных энтомопатогенными грибами, качественно ничем не отличаются от гемоцитов интактных тараканов, что наглядно видно в сравнении рис. 2 и рис. 4.

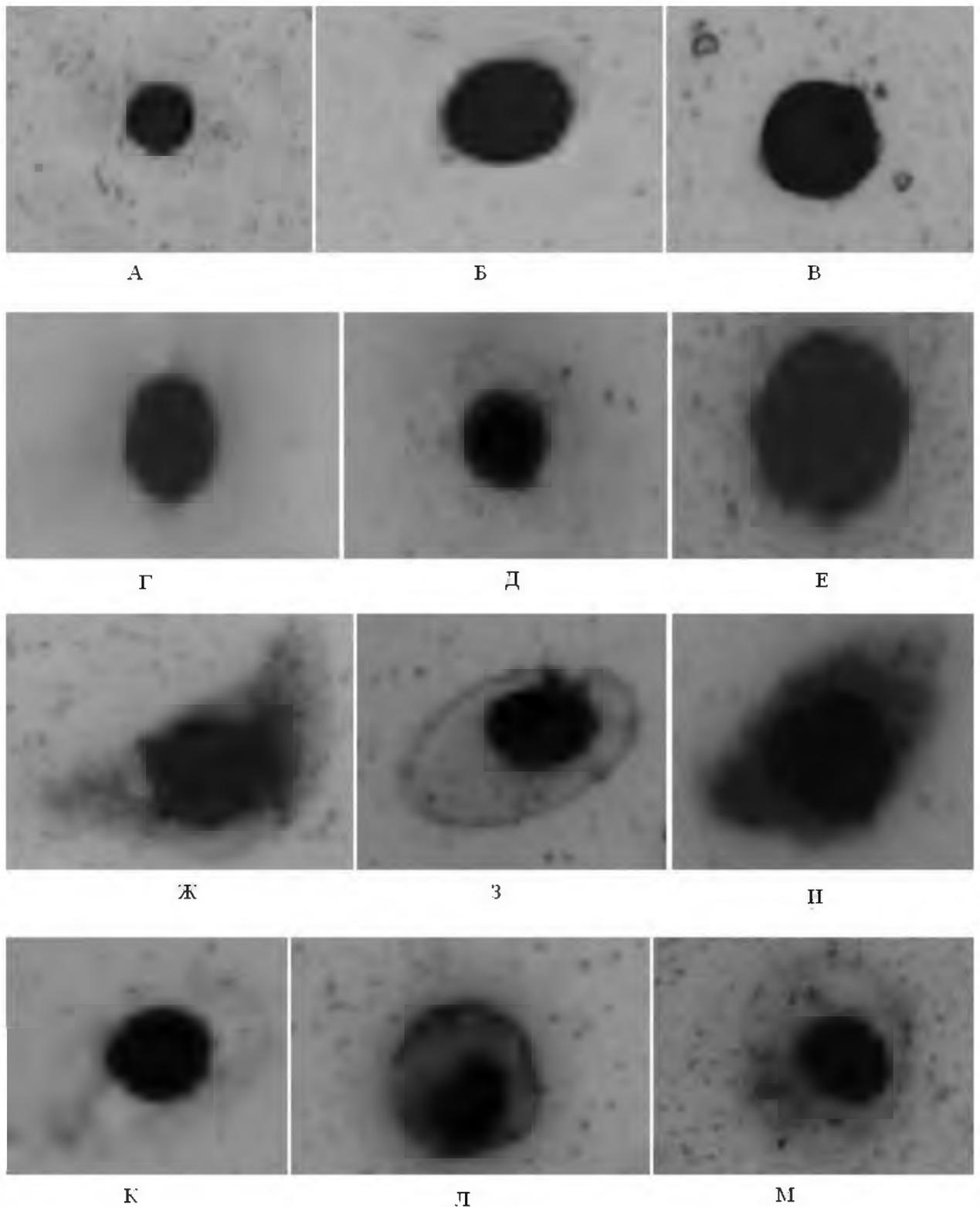


Рис. 4. Типы гемоцитов тараканов. А – прогемоциты *N. cinerea*, пораженного *Beauveria bassiana*; Б – прогемоциты *N. cinerea*, пораженного *Paecilomyces farinosus*; В – прогемоциты *N. cinerea*, пораженного *Paecilomyces lilacinus*; Г – прогемоциты *N. cinerea*, пораженного *Metarhizium anisopliae*; Д – прогемоциты *N. cinerea*, пораженного *Scopulariopsis brevicaulis*; Е – прогемоциты *N. cinerea*, пораженного *Scopulariopsis fuscum*;

Ж – плазматоциты *N. cinerea*, пораженного *Beauveria bassiana*; З – плазматоциты *N. cinerea*, пораженного *Paecilomyces farinosus*; И – плазматоциты *N. cinerea*, пораженного *Paecilomyces lilacinus*; К – плазматоциты *N. cinerea*, пораженного *Metarhizium anisopliae*; Л – плазматоциты *N. cinerea*, пораженного *Scopulariopsis brevicaulis*; М – плазматоциты *N. cinerea*, пораженного *Scopulariopsis fuscum*.

Однако при воздействии на тараканов патогенами количество различных типов клеток изменяется. Так, количество сфероцитов и гранулоцитов значительно снизилось по сравнению с интактными тараканами, а прогемоцитов и плазматоцитов увеличилось (Таблица 3).

Таблица 3

Количество разных типов гемоцитов в пораженных тараканах *N. cinerea*

Гемоциты Патоген	Количество гемоцитов, %			
	Прогемоциты	Плазматоциты	Сфероциты	Гранулоциты
<i>Beauveria bassiana</i>	48,945	46,875	2,785	2,29
<i>Beauveria bassiana</i>	35,14	58,31	3,13	3,74
<i>Paecilomyces farinosus</i>	29,96	66,15	2,25	1,62
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	44	48,29	4,21	1,75
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	17,75	72,4	6,52	3,31
<i>Scopulariopsis fuscum</i>	13,15	80	2,6	3,9
<i>Metarhizium anisopliae</i>	11,7	81,2	3,9	3
<i>Metarhizium anisopliae</i>	16,37	76,49	3,57	3,57
Интактные тараканы	16	50	11,11	22,22

Грибы разных родов по-разному влияли на картину гемолимфы *N. cinerea* (рис. 5).

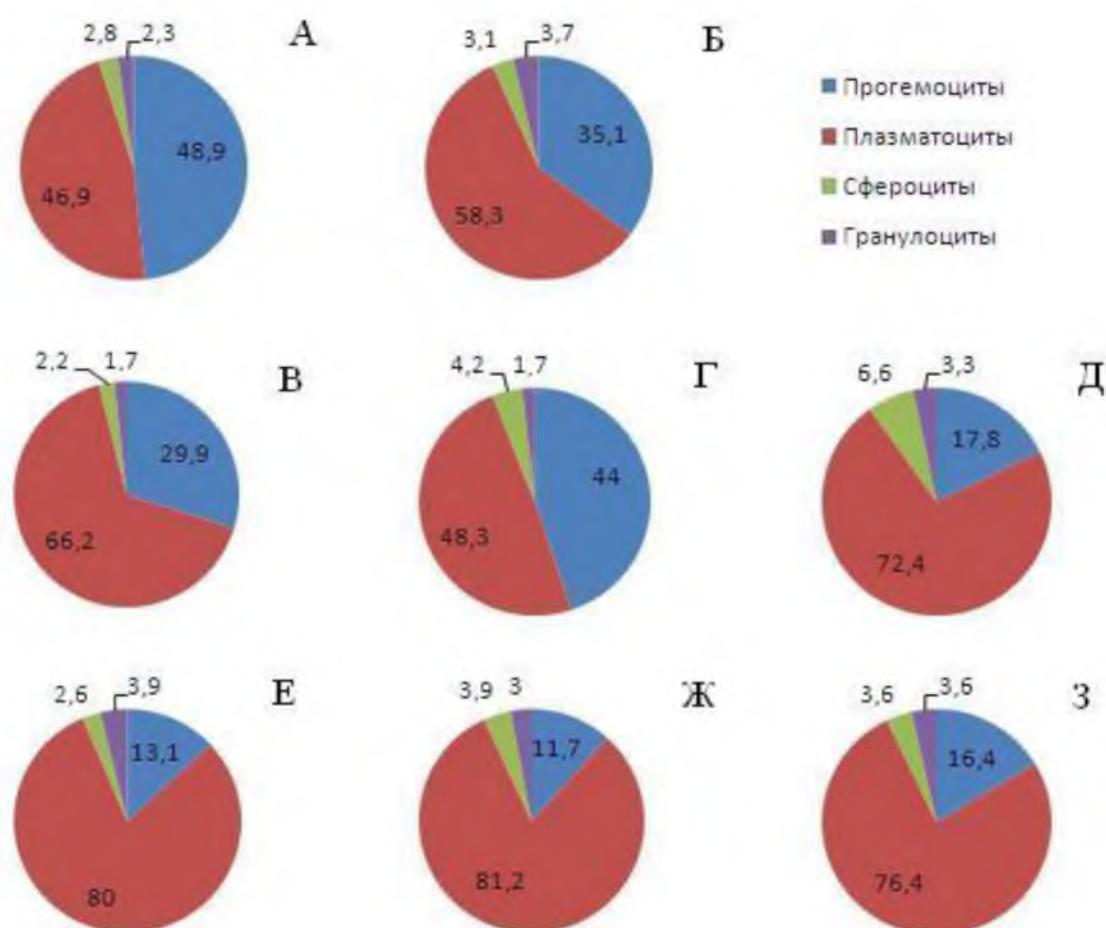


Рис. 5. Соотношение гемоцитов (%) *N. cinerea* при поражении некоторыми энтомопатогенными грибами. А - *Beauveria bassiana* (1); Б - *Beauveria bassiana* (2); В - *Paecilomyces farinosus*; Г - *Paecilomyces lilacinus*; Д - *Scopulariopsis brevicaulis*; Е - *Scopulariopsis fuscum*; Ж - *Metarhizium anisopliae* (1); З - *Metarhizium anisopliae* (2);

Из рис. 5 видно, что при поражении грибом *Beauveria bassiana* и грибами рода *Paecilomyces* существенно увеличивается количество прогемоцитов, при этом количество плазматочитов остается на том же уровне, что и у интактных тараканов. Однако гранулоциты и сфероциты становятся единичными клетками, соотношение которых не превышает 4%.

Иная картина гемолимфы наблюдается при заражении грибами родов *Scopulariopsis* и *Metarhizium*. При заражении этими грибами отмечено значительное увеличение количества плазматоцитов, доля которых достигала почти 82%. Однако количество прогемоцитов по сравнению с интактными тараканами изменялось чуть более 5%. По аналогии с поражениями грибами *Beauveria* и *Paecilomyces*, доля сфероцитов и гранулоцитов также снижалась и приближалась к количеству, близкому к единичным клеткам.

Необходимо заметить, что при заражении грибом *Metarhizium anisopliae*, который пересекали три раза (наименьшее число пересечений из всех исследованных вариантов грибов), все насекомые погибли к 12 суткам.

Следует отметить, что данный гриб, пересеянный более 4-х раз, оказался малоэффективным (слабопатогенным) по отношению к таракану *Nauphoeta cinerea*.

Таким образом, из всех исследованных изолятов грибов, *Metarhizium anisopliae*, пересеянный три раза, оказался наиболее энтомопатогенным по отношению к таракану *Nauphoeta cinerea*. Из литературы известно энтомопатогенное действие данного гриба в отношении многих насекомых. Анаморфный аскомицет *Metarhizium anisopliae* является одним из наиболее распространенных энтомопатогенных грибов. Он способен поражать сотни видов насекомых из разных отрядов. Кроме того, данный гриб активно используется во всем мире для создания микоинсектицидных препаратов (Ярославцева, 2012).

Полученный результат свидетельствовал о необходимости проведения более глубокого исследования патогенности варианта гриба *Metarhizium anisopliae*, который пересекали три раза.

Следует отметить, что у пораженных грибами насекомых скорость сворачивания гемолимфы значительно выше, чем у интактных.

### 3.3. Влияние влажности субстрата на выживаемость *Nauphoeta cinerea*

В контейнере с влажностью 34% насекомые в состоянии покоя старались находиться на поверхности крылаток, ближе к открытому воздуху, после механического воздействия на контейнер перемещались под субстрат. Отмечено, что насекомые отличались малоподвижностью. В контейнере с влажностью 87,7% у насекомых не наблюдалось малоподвижности или любых других патологий. Кроме того, на шестые сутки замечено потомство, что свидетельствует о нормальном функционировании насекомых. В контейнере с влажностью 156,4% отмечено, что насекомые находились под субстратом, ближе к остаткам влаги. Насекомые были крайне малоподвижны, почти не реагировали на прикосновения пинцетом. Более того на третьи сутки было обнаружено два трупа таракана, с течением времени и ходом эксперимента количество трупов увеличивалось (рис. 6).

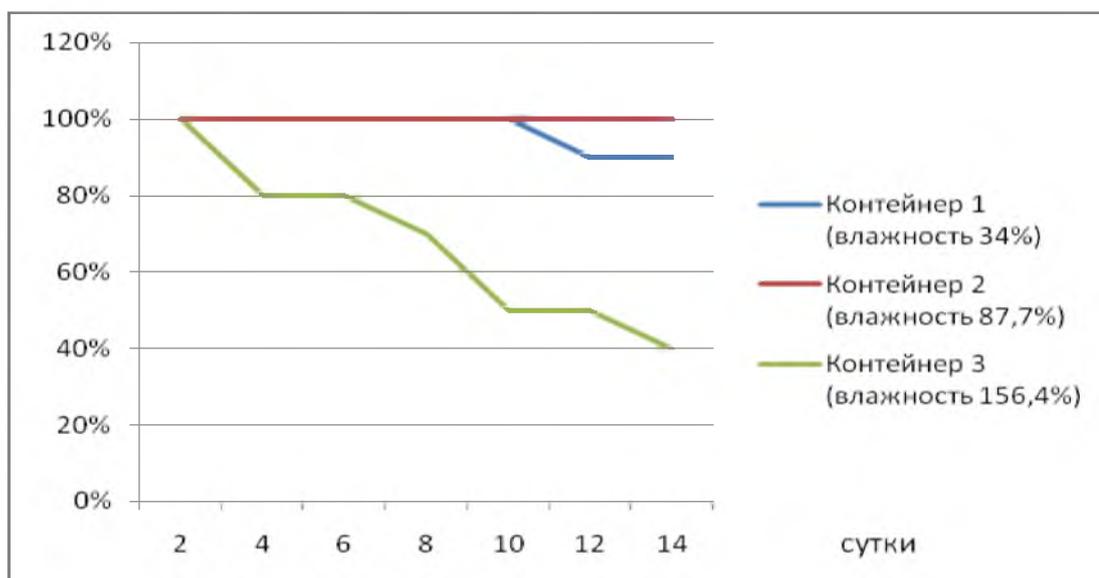


Рис. 6. Влияние влажности субстрата на выживаемость *Nauphoeta cinerea*

Таким образом, оптимальной влажностью субстрата для жизнеспособности *Nauphoeta cinerea*, является 87,7%. Именно эта влажность была выбрана для исследования изолятов *M. anisopliae*.

3.4. Влияние заражения различными изолятами *Metarhizium anisopliae* на гемоциты *Nauphoeta cinerea*.

Основными клетками интактных тараканов *Nauphoeta cinerea* являются прогемоциты, плазматоциты, гранулоциты, сфероциты. Около половины всех клеток гемолимфы составляют плазматоциты (рис. 7).

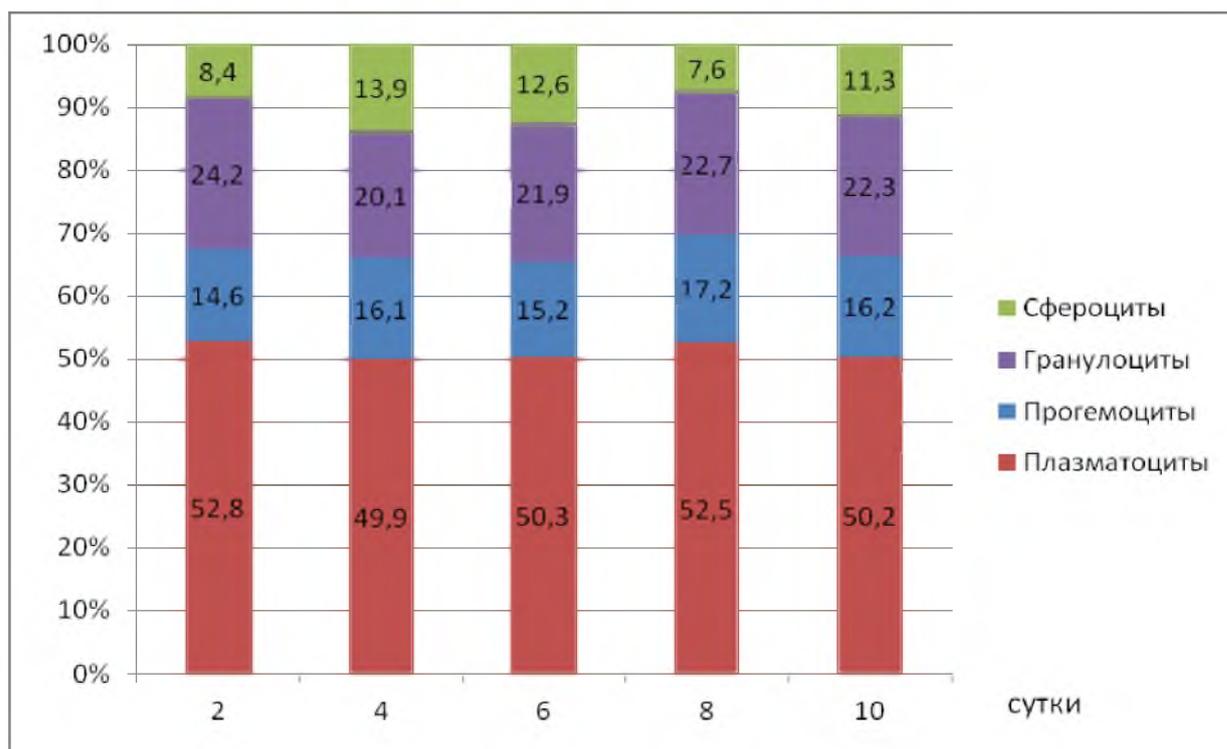


Рис. 7. Соотношение (%) разных типов гемоцитов интактных тараканов *N. cinerea*

Из рис. 7 видно, что вторыми по численности гемоцитами являются гранулоциты, которые составляли от 20 до 24,5% от всех клеток. Прогемоциты, являющиеся дифференцирующимися клетками, как утверждают некоторые исследователи, составили от 15 до 17% (Тыщенко, 1986). Наименьшее количество из основных клеток составили сфероциты, их количество не превышало 14%.

В период наблюдений количество различных типов гемоцитов изменялось незначительно.

При изучении влияния различных изолятов *M. anisopliae* на тараканов *N. cinerea* были отмечены различные изменения в соотношении гемоцитов. Так, при содержании насекомых на субстрате с изолятом 1 изменение количества всех типов гемоцитов происходило волнообразно (рис.8) и было приближено к количеству гемоцитов интактных тараканов.

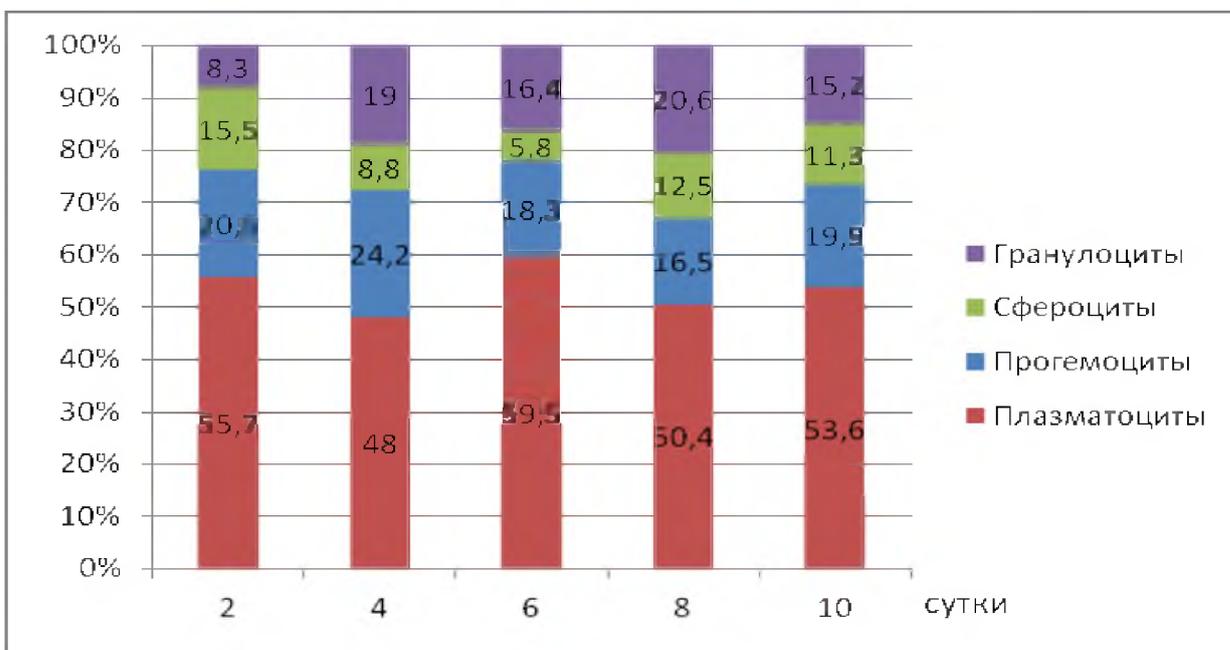


Рис. 8. Соотношение (%) разных типов гемоцитов *N. cinerea* при заражении энтомопатогенным грибом *M.anisopliae* (изолят 1)

На рис. 8 видно, что не было отмечено значительных изменений в соотношении гемоцитов.

При содержании насекомых на субстрате с изолятом 2 изменения в соотношении различных типов гемоцитов носили более выраженный характер (рис.9). На рис. 9 можно заметить резкое увеличение количества прогемоцитов в первые дни опыта, а затем их стабилизацию, что, возможно, приводило к нормализации состояния насекомых, т.к. гибели тараканов в контейнере с данным изолятом грибов не было обнаружено. Однако, нельзя не отметить увеличение доли плазматоцитов на протяжении всего опыта.

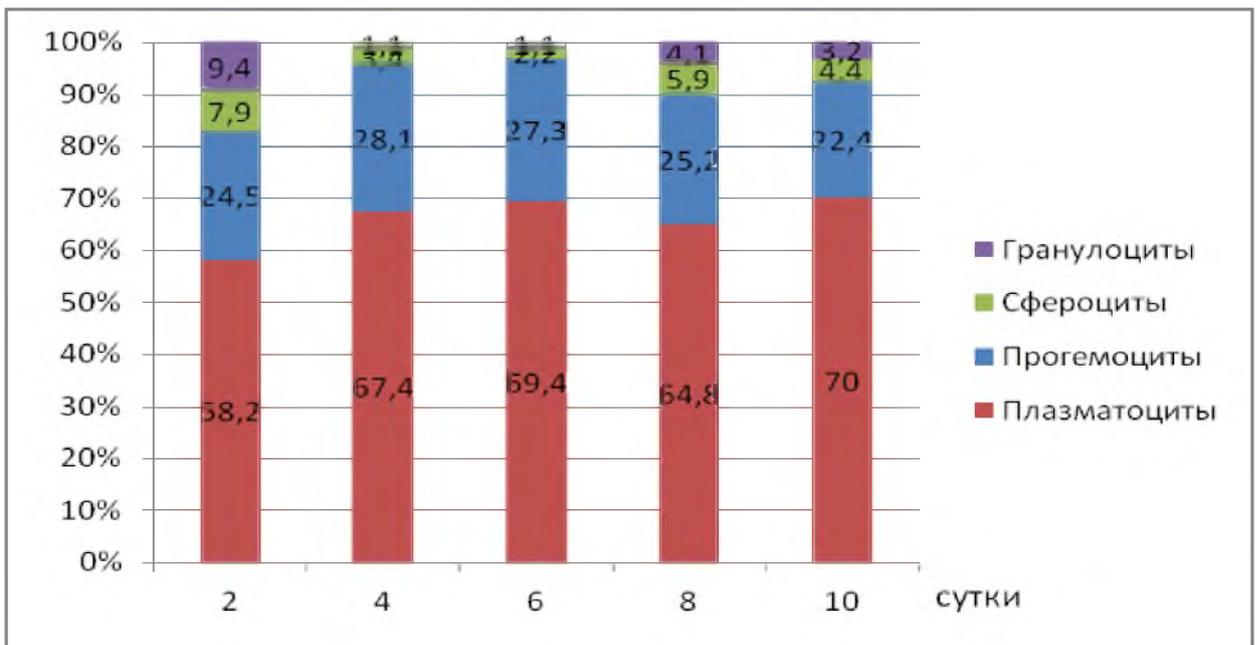


Рис. 9. Соотношение (%) разных типов гемоцитов *N. cinerea* при заражении энтомопатогенным грибом *M.anisopliae* (изолят 2)

При содержании насекомых на субстрате, зараженном изолятом 3, отмечены существенные изменения по сравнению с интактными насекомыми в соотношении различных типов гемоцитов (рис. 10).

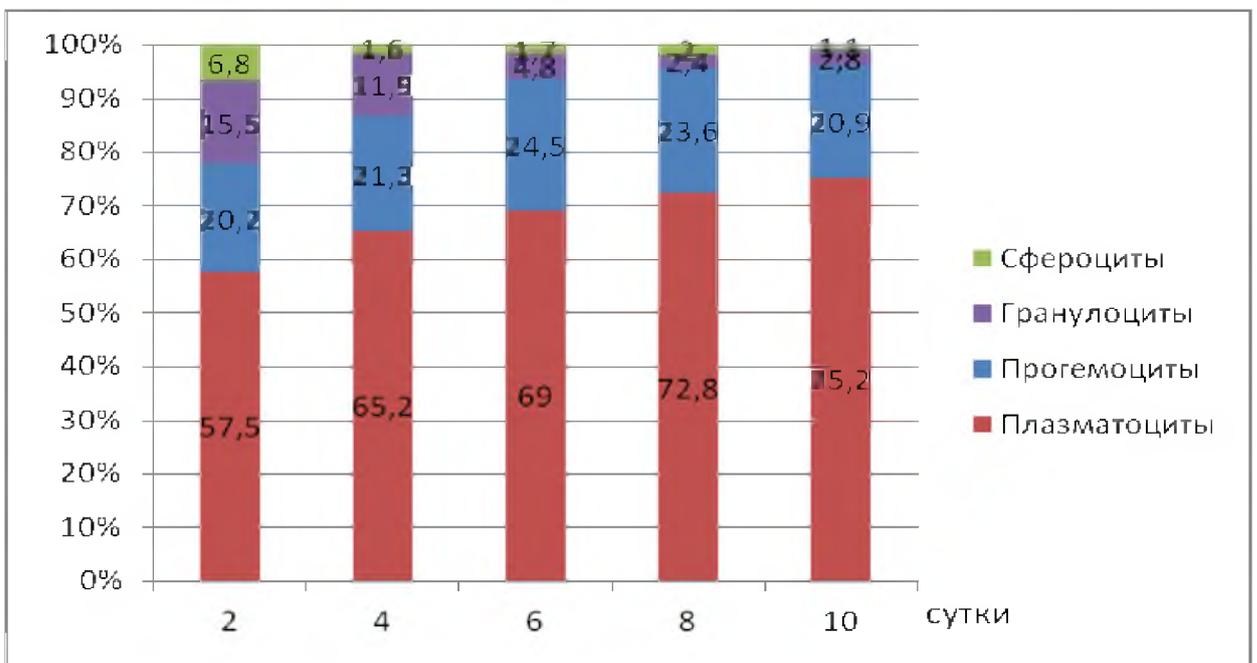


Рис. 10. Соотношение (%) разных типов гемоцитов *N. cinerea* при заражении энтомопатогенным грибом *M.anisopliae* (изолят 3)

Из рис. 10 видно, что при заражении *N. cinerea* изолятом 3, существенно увеличивается количество плазматоцитов на вторые и четвертые сутки опытов, после чего динамика увеличения снижалась, но продолжала расти. Важно отметить долю прогемоцитов, которая увеличивалась до шестых суток, а затем восстановилась до исходного значения. Также замечено резкое снижение количества гранулоцитов.

Наибольшие изменения в соотношении различных типов гемоцитов отмечены при заражении насекомых изолятом 4 (рис. 11).

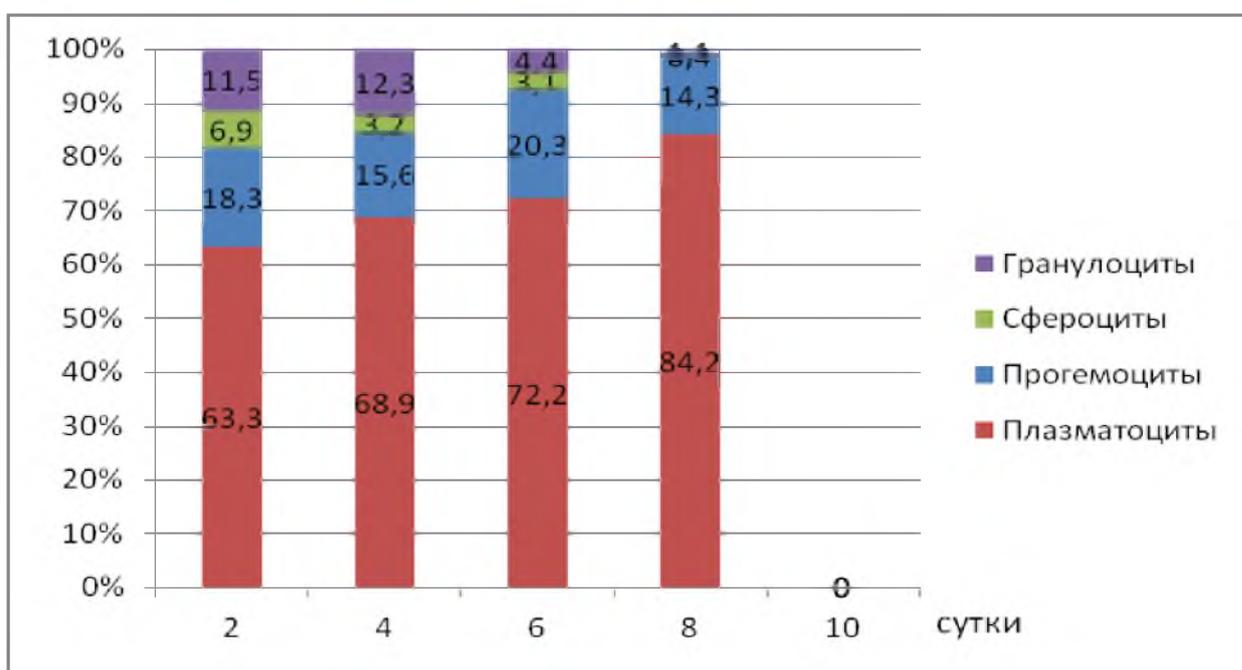


Рис. 11. Соотношение (%) разных типов гемоцитов *N. cinerea* при заражении энтомопатогенным грибом *Manisopliae* (изолят 4)

Рис. 11 демонстрирует резкое увеличение количества плазматоцитов и сокращение числа других клеток, что характеризуется высокой патогенностью гриба. Важно отметить, что на десятые сутки опыта было обнаружено несколько трупов тараканов.

Из вышеуказанных диаграмм следует, что наиболее патогенным оказался реизолят *Metarhizium*, который был выделен из таракана с наиболее поздним сроком посева. Многие исследователи отмечают, что патогенность

некоторых грибов, в частности *M.anisopliae*, увеличивается после прохождения его через тело насекомых. Также, важным фактором патогенности грибов является срок его посева. Из наших опытов видно, что максимальной патогенностью, приводящей к гибели насекомых уже на десятые сутки эксперимента, является реизолят *M. anisopliae*, соответствующий именно таким факторам.

## ВЫВОДЫ

1. В гемолимфе *Nauphoeta cinerea* присутствуют основные типы гемоцитов: прогемоциты, плазматоциты, сфероциты, гранулоциты. Единично встречаются адипогемоциты.

2. Заражение грибами (*Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Metarhizium anisopliae*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Scopulariopsis fuscum*) не вызывает качественных изменений в картине гемоцитов *Nauphoeta cinerea*. Однако взаимодействие грибов с насекомыми приводит к численному увеличению плазматоцитов и значительному уменьшению количества гранулоцитов и сфероцитов.

3. Для выживания *Nauphoeta cinerea* оптимальная влажность субстрата – 87,7%.

4. Наибольшие изменения в соотношении различных типов гемоцитов *Nauphoeta cinerea* отмечены при заражении насекомых реизолятом *Metarhizium anisopliae* с минимальным сроком давности высева.

## Список литературы

1. ГОСТ 28268 – 89. Почвы. Методы определения влажности, максимальной гигроскопической влажности и влажности устойчивого завядания растений.
2. Дубовский И.М. – Эволюция резистентности вошинной огневки *Galleria mellionella* (L.) к энтомопатогенным бактериям и грибам. – Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Новосибирск, 2015. – 287 с.
3. Евлахова А.А. – Энтомопатогенные грибы. – Издательство «НАУКА», Ленинград, 1974. – 260 с.
4. Захваткин Ю. А. – Курс общей энтомологии. – Издательство: М.: Колос, 2001. – 376 с.
5. Иноземцев А.Н., Тушмалова Н.А., Ужиков Д.П., Целкова Н.В., Бернуй Л.Х. Влияние пирецетама на поведение тараканов *Nauphoeta cinerea* в открытом поле // Журнал высшей нервной деятельности им.И.П.Павлова. — 1998. — N 2. — С.260-266.
6. Коваль Э.З. – Определитель энтомопатогенных грибов СССР. – Издательство «НАУКОВА ДУМКА», Киев, 1974. – 260 с.
7. Кочетова Н.И. Форменные элементы гемолимфы в постэмбриональном развитии таракана *Nauphoeta cinerea* // Зоологический журнал, 1978, том LVII, вып. 2, С. 206–213.
8. Крюков В.Ю. – Адаптации энтомопатогенных аскомицетов (Ascomycota, Нурocreales) к насекомым-хозяевам и факторам среды в условиях континентального климата западной Сибири и Казахстана. - Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Новосибирск, 2014. – 249 с.
9. Мжаванадзе Ж.И. – Энтомопатогенные грибы западной Грузии и перспективы их практического использования в защите растений. –

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Тбилиси, 1985. – 163 с.

10. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты//под ред. В. В. Глупова – Издательский дом «Круглый год». Москва, 2001. – 736 с.

11. Росс Г. и др. – Энтомология. – М. Мир, 1985. – 576с.

12. Тыщенко В.П. – Основы физиологии насекомых. Ч. 1. Физиология метаболических систем. – Издательство Ленинградского Университета, 1976. – 364 с.

13. Тыщенко В.П. Физиология насекомых. — М.: Высшая школа, 1986. – 303 с.

14. Чикин Ю.А., Лукьянцев С.В. Распространение условно-патогенных грибов синантропными тараканами//Вестник Томского государственного университета. Биология. 2008, № 3 (4), С. 55- 61.

15. Шовен Р. – Физиология насекомых. – Издательство иностранной литературы, Москва, 1953. – 497 с.

16. Э. Штейнхауз. Патология насекомых. – Издательство иностранной литературы. 1952. – 804 с.

17. Элпидина Е. Н., Винокуров К. С., Громенко В. А. и др. Протеиназы средней кишки таракана *Nauphoeta cinerea* //Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii. — 2000. — Т. 36, № 4. — С. 286–292.

18. Ярославцева О. – Иммунная и детоксирующая системы насекомых при развитии различных типов микозов. – Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 2012. – 23 с.

19. Fassatiova O. – O isariovych formach entomofaynich hun. – Ceska mycol. 1955. 25.

20. [https://ru.wikipedia.org/wiki/Nauphoeta\\_cinerea](https://ru.wikipedia.org/wiki/Nauphoeta_cinerea)

21. Kryukov V. Yu., Yaroslavtseva O. N., Dubovskiy I. M., Tyurin M. V., Kryukova N. A., Glupov V. V. – Insecticidal and immunosuppressive effect of Ascomycete *Cordyceps militaris* on the larvae of the Colorado Potato Beetle

*Leptinotarsa decemlineata* // *Izvestiya Akademii Nauk, Seriya Biologicheskaya*, 2014, No. 3, pp. 296–303.

22. Maryam Ajamhassani, Jalal Jalali Sendi. Immunological responses of *Hyphantria cunea* (Drury) (*Lepidoptera: artiidae*) to entopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (bals.-criy) and *Isaria farinosae* (Holmsk.) FR. // *Journal of plant protection research*, 2013, Vol. 53, No. 2. , P. 110–118.

23. Silva J. E. B., Boleli I. C. – Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. - *Braz. J. Biol.*, 62(4A): 689–699, 2002.

Уважаемый пользователь! Обращаем ваше внимание, что система «Антиплагиат» отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение.

## Отчет о проверке № 1

дата выгрузки: 14.06.2016 06:45:04  
 пользователь: [koshkin94@list.ru](mailto:koshkin94@list.ru) / ID: 3176188  
 отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»  
 на сайте <http://www.antiplagiat.ru>

### Информация о документе

№ документа: 6  
 Имя исходного файла: Курсовая\_правки 140616.doc  
 Размер текста: 948 кБ  
 Тип документа: Не указано  
 Символов в тексте: 53022  
 Слов в тексте: 6267  
 Число предложений: 408

### Информация об отчете

Дата: Отчет от 14.06.2016 06:45:04 - Последний готовый отчет  
 Комментарий: не указано  
 Оценка оригинальности: 88.6%  
 Заимствования: 11.4%  
 Цитирование: 0%



Оригинальность: 88.6%

Заимствования: 11.4%

Цитирование: 0%

### Источники

Доля в тексте	Источник	Ссылка	Дата	Найдено в
3.11%	[1] пчёлы +.doc	<a href="http://inethub.olvi.net.ua">http://inethub.olvi.net.ua</a>	25.04.2014	Модуль поиска Интернет
2.49%	[2] zahvatkin.djvu	<a href="http://inethub.olvi.net.ua">http://inethub.olvi.net.ua</a>	22.04.2014	Модуль поиска Интернет
1.64%	[3] Гемолимфа	<a href="http://ru.wikipedia.org">http://ru.wikipedia.org</a>	раньше 2011 года	Модуль поиска Интернет

