

## Накопление метаболитов энтомопатогенного гриба *Cordyceps militaris* в личинках вошинной огнёвки *Galleria mellonella* L.

### Production of *Cordyceps militaris* metabolites in infected wax moth *Galleria mellonella* L. larvae

М.В. Тюрин\*, Т.И. Алюшина\*\*, О.Г. Томилова\*,  
Е.И. Савельева\*\*, В.Ю. Крюков\*, А.О. Берестецкий\*\*\*  
M.V. Tyurin\*, T.I. Alyushina\*\*, O.G. Tomilova\*, E.I. Saveleva\*\*,  
V.Yu. Kryukov\*, A.O. Berestetskiy\*\*\*

\* Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе 11, Новосибирск 630091 Россия. E-mail: maktolt@gmail.com.

\* Institute of Systematics and Ecology of Animals, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Frunze Str. 11, Novosibirsk 630091 Russia.

\*\* Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ст. Капитолово, корп. № 93, Ленинградская область, г.п. Кузьмоловский 188663 Россия.

\*\* Federal State Unitary Enterprise «Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology» art. Kapitolovo, build. № 93 Leningradskaya Oblast, g.p. Kuzmolovskiy 188663 Russia.

\*\*\* Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, ул. Подбельского 3, Санкт-Петербург–Пушкин 196608 Россия.

\*\*\* All-Russian Research Institute of Plant Protection, Podbelskogo Str. 3, St.-Petersburg–Pushkin 196608 Russia.

**Ключевые слова:** кордицепин, *Cordyceps militaris*, *Galleria mellonella*, микозы насекомых, токсины грибов.

**Key words:** Cordycepin, *Cordyceps militaris*, *Galleria mellonella*, mycosis, fungal toxins.

**Резюме.** Впервые показана динамика накопления токсинов *Cordyceps militaris* в личинках вошинной огнёвки *Galleria mellonella* после инъекций бластоспор гриба в гемоцель насекомых. На 3–4 сутки развития микоза (т.е. за 1–2 сутки до гибели) концентрация кордицепина составляла в среднем  $244 \pm 41$  нг/на 100 мг сухой массы гусениц. У личинок, парализованных ядом паразитоида *Habrobracon hebetor*, накопление кордицепина шло с запаздыванием на одни сутки. Концентрации кордицепина зависели от количества гифальных тел в гемолимфе, но данные корреляции регистрировались лишь на уровне тенденций ( $P > 0,07$ ). Обсуждена роль токсинов *Cordyceps militaris* при развитии микозов.

**Abstract.** This study examines accumulation dynamics of *Cordyceps militaris* toxins in wax moth *Galleria mellonella* larvae after injection of fungal blastospores. At 3 and 4 days post infection average concentration of cordycepin was  $244 \pm 41$  ng per 100 mg of dry mass of larvae. Accumulation of cordycepin was delayed one day in larvae, that were envenomated, by parasitoid *Habrobracon hebetor* (Say). Cordycepin concentration was correlated with hyphal bodies count in hemolymph, but only on tendency level ( $P > 0.07$ ). The role of *Cordyceps militaris* toxins in the development of mycoses was discussed.

## Введение

Грибы *Cordyceps militaris* выступают естественными регуляторами численности чешуекрылых, вы-

зывая периодические эпизоотии в их популяциях [Kamata, 2000; Kryukov et al., 2011]. Метаболиты этого гриба активно изучаются в фармакологии [Holliday, Cleaver, 2008; Paterson, 2008; Tuli et al., 2013], однако их роль в развитии микозов насекомых изучена очень слабо. Одним из мажорных экзометаболитов *C. militaris* является кордицепин (3'-дезоксисаденозин). Метаболит синтезируется грибом при развитии на искусственных питательных средах, а также в склероциях, находящихся в трупах насекомых и в стромах [Hug, 2008]. Кордицепин терминирует синтез нуклеиновых кислот и обладает цитотоксической активностью [Holliday, Cleaver, 2008]. Инсектицидная активность кордицепина показана Kim et al. [2002] на *Plutella xylostella* L. Тератогенный эффект данного метаболита на куколок вошинной огнёвки *Galleria mellonella* L. установлен Робертсом [Roberts, 1981]. Нами ранее показано, что инъекции или скормливание кордицепина приводят к задержке развития (вплоть до полной остановки роста) вошинной огнёвки [Крюков, 2015] и колорадского жука [Крюков et al., 2014]. Однако физиологические концентрации кордицепина в организме насекомых при патогенезах, вызываемых *C. militaris*, остаются неустановленными. Кроме того, неизвестно, какие другие метаболиты, образуемые грибом, могут ещё детектироваться при развитии микозов. Цель данной работы — при помощи метода высокоразрешаю-

шей масс-спектрометрии установить содержание кордицепина и других веществ, известных у *Cordyceps* spp., в личинках *G. mellonella* при развитии микозов *C. militaris*, проанализировать динамику накопления данных веществ у личинок с разным физиологическим состоянием.

## Материалы методы

**Грибы, насекомые и заражение.** Бластоспоры *C. militaris* (изолят СНА) получены путём глубинного культивирования на модифицированной среде Сабуро [Kryukov et al., 2018]. Бластоспоры центрифугировали при 10000 G, +4 °C и промывали в 0,9 % растворе NaCl дважды, после чего хранили при температуре –20 °C.

В работе использована лабораторная линия *Galleria mellonella* западносибирского происхождения. Личинок выращивали на искусственной питательной среде [Kryukov et al., 2018]. При этом были использованы нативные личинки и личинки, парализованные ядом *H. hebetor*. Ранее показано, что парализация данным ядом резко снижает уровень инкапсуляции и фенолоксидазы в гемолимфе [Kryukova et al., 2011] и повышает восприимчивость к энтомопатогенным грибам, в том числе к *C. militaris* [Kryukov et al., 2018]. Парализацию личинок ядом проводили путём подсадки самок паразитоида к личинкам воициной огнёвки по методике, описанной ранее [Kryukova et al., 2011].

Каждую личинку инъецировали 3 мкл физраствора, содержащими 10 тыс. бластоспор *C. militaris*. Контрольных личинок инъецировали 3 мкл физраствора. Личинок содержали в чашках Петри (10 личинок на одну чашку) при температуре 25 °C. На 3 и 4 сут (период колонизации грибом гемоцеля, т.е. появления гифальных тел в гемолимфе) насекомые были заморожены и лиофилизированы по методике, описанной Ríos-Moreno с соавт. [Ríos-Moreno et al., 2017]. Кроме того, в данных временных точках проводился подсчёт гифальных тел в гемолимфе насекомых по методике, описанной Томиловой с соавторами [Tomilova et al., 2016].

**Экстракция токсинов из биоматериала и оп-ределение методом тандемной жидкостной хро-матомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) высо-кого разрешения.** Каждый образец состоял из трёх личинок, которых лиофилизировали, взвешивали, гомогенизировали и обрабатывали 5 мл метанола на возвратной качалке в течение 20 минут и далее в ультразвуковой ванне в течение 5 минут. Затем экстракт пропускали через шприцевой фильтр с диаметром ячейки 0,2 мкм и высушивали с помощью ротационного испарителя. Для анализа сухой остаток перерастворяли в смеси ацетонитрил–метанол (1:1), встряхивали на вортексе в течение 15 минут, затем центрифугировали при скорости вращения ротора 14000 об./мин. Супернатант анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматографическое разделение компонентов экстрактов осуществлялось с использованием хроматографа Dionex Ultimate 3000 на колонке ZorbaxSB-C8 длиной 15 см и внутренним диаметром 4,6 мм, с размером частиц 1,8 мкм. Подвижная фаза включала 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в воде для ВЭЖХ и ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ. Режим элюирования — градиентный с общим временем анализа 20 мин: 5 % ацетонитрила (в течение 1 мин), 5–90 % (6 мин), 90 % ацетонитрила (8 мин), 5 % ацетонитрила (5 мин). Условия хроматографирования были следующими: скорость подачи элюента 0,4 мл/мин, температура термостата колонки 35 °C, температура термостата для проб 5 °C, объём вводимой пробы 5 мкл.

Определение метаболитов, характерных, по литературным данным, для грибов рода *Cordyceps sensu lato* осуществляли на гибридном (квадруполь-орбитальная ионная ловушка) хроматомасс-спектрометре высокого разрешения Q Exactive (Thermo Scientific) с использованием хроматографической колонки жидкостного хроматографа с последующим детектированием разделённых компонентов детектором, настроенным на регистрацию характеристичных ионов. Способ ионизации электростатическим распылением при атмосферном давлении; режим сканирования 80–1500 m/z в отрицательной и положительной полярности. Режим работы источника ионизации — HESI, поток газа-распылителя — 60 отн. ед., поток вспомогательного газа — 20 отн. ед., напряжение на распылителе — 3 кВ, температура проводящего капилляра — 380 °C, температура распылителя — 250 °C. Идентификацию веществ проводили по точным масс-фрагментам m/z, соответствующим  $[M+H]^+$  и  $[M-H]^+$ . Ошибка измерения точной массы и элементного состава иона (отличие измеренной массы от расчётной) составляет менее 5 ppm, что позволяет считать проведённую идентификацию достоверной.

**Статистика.** Статистическая обработка данных проведена в программе Statistica 8. Ввиду ненормального распределения (критерий Шапиро-Уилка,  $p < 0,05$ ) данные были преобразованы в Log10 и затем проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением Тьюки.

## Результаты

Гибель инъецированных *C. militaris* насекомых регистрировалась на 5–6-е сутки. Все парализованные и не парализованные ядом гусеницы погибли к данному времени с симптоматикой, характерной для микоза (образование мумий). В контрольном варианте (инъекция физраствором) гибели личинок не регистрировалось. Число гифальных тел в заражённых *C. militaris* гусеницах увеличивалось от третьих к четвёртым суткам развития микоза (рис. 1). Интересно, что в парализованных гусеницах регистриро-

валось меньшее количество гифальных тел в гемолимфе по сравнению с непарализованными, однако различия были только на уровне тенденции (эффект парализации:  $F_{1,19} = 1,9, p = 0,18$ ).

В инфицированных грибом гусеницах были детектированы кордицепин и кордицепсамиды А, В, С и D (рис. 2). В контрольных (незаражённых) гусеницах данные соединения не обнаружены. Содержание кордицепина в инфицированных гусеницах составляло в среднем от  $244 \pm 41$  нг/на 100 мг сухой массы гусениц или  $52 \pm 9$  нг на одну личинку пятого возраста; при этом отмечено значительное варьирование (абсолютные минимум и максимум: 4–650 на 100 мг сухой массы). Концентрация данного метаболита существенно увеличивалась с 3-их на 4-е сутки после инфицирования (эффект суток:  $F_{1,19} = 9,3, p = 0,007$ ). В парализованных гусеницах содержание кордицепина оказалось существенно ниже, чем в непарализованных (эффект парализации:  $F_{1,19} = 13,0, p = 0,002$ ), при этом значительные (8,5-кратные) различия отмечались на 3-и сутки после инфицирования (Тьюки тест:  $p = 0,004$ ), а на 4-е сутки содержание кордицепина в парализованных личинках было лишь в 1,3 раза ниже, чем в непарализованных и различалось не существенно (Тьюки тест:  $p = 0,72$ ).

Вторым мажорным метаболитом гриба, детектируемым в заражённых личинках, был кордицепсамид В. Его содержание составляло в среднем  $277 \pm 32$  нг/на 100 мг сухой массы гусениц. Как и для кордицепина, концентрация данного метаболита оказалась ниже в парализованных гусеницах по сравнению с непарализованными ( $F_{1,19} = 5,9, p = 0,026$ ). Также наблюдалась тенденция к повышению концентрации в зависимости от времени после заражения, но эффект оказался несущественным ( $F_{1,19} = 0,47, p = 0,50$ ). Корреляции между концентрацией бластоспор в гемолимфе и содержанием обоих компонентов — кордицепина и кордицепсамид В — оказались на уровне отчётливых тенденций ( $r = 0,38,$

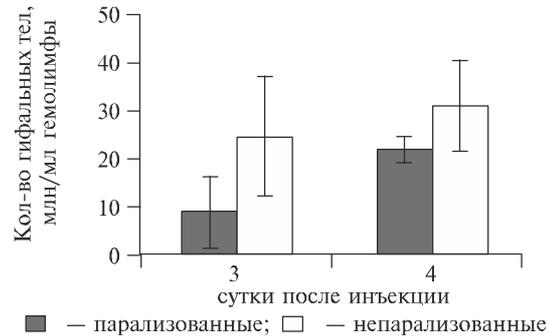


Рис. 1. Количество гифальных тел в личинках вошинной огнёвки *Galleria mellonella* на 3 и 4 сутки после инъектирования бластоспор *Cordyceps militaris*. Вертикальные линии показывают ошибки средних арифметических.

Fig. 1. Concentration of hyphal bodies in wax moth *Galleria mellonella* larvae at 3 and 4 days post injection with blastospores of *Cordyceps militaris*. Vertical bars show standard errors.

$p = 0,07$  и  $r = 0,35, p = 0,10$  соответственно). Корреляция между уровнем кордицепина и кордицепсамид В была тесной и высокодостоверной ( $r = 0,74, p < 0,0001$ ). Кордицепсамиды А, С и D были обнаружены в заражённых гусеницах в значительно меньших количествах (рис. 2), и существенных трендов, связанных с парализацией и временем после заражения, не выявлено.

## Обсуждение

Сниженное количество гифальных тел в парализованных паразитоидом личинках, по всей видимости, обусловлено отсутствием циркуляции гемолимфы. Кроме того, у парализованных гусениц из-за отсутствия перистальтики кишечника происходит неконтролируемое размножение кишечных бактерий, которые могут выступать антагонистами энтомопатогенных грибов [Polenogova et al., неопубликованные данные]. Полученные данные свидетельствуют о том, что со-

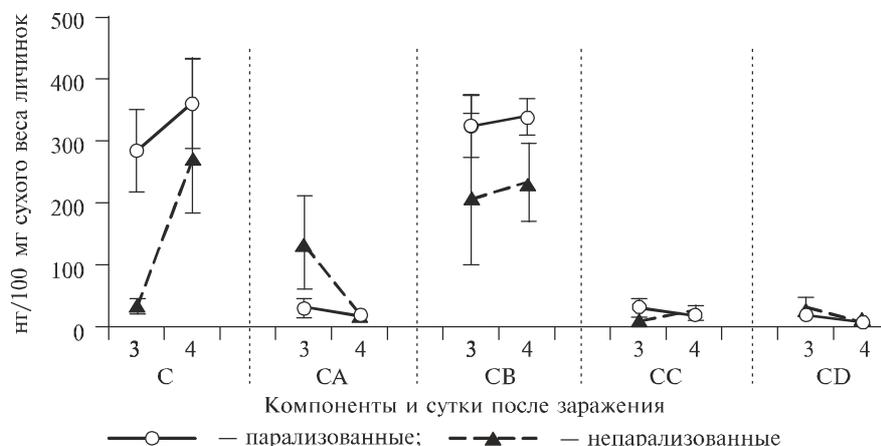


Рис 2. Концентрации кордицепина (С) и кордицепсамидов А, В, С и D (СА, СВ, СС и CD соответственно) в личинках вошинной огнёвки *Galleria mellonella* на 3 и 4 сутки после инъектирования бластоспор *Cordyceps militaris*. Вертикальные линии показывают ошибки средних арифметических.

Figure 2. Concentrations of cordycepin (C) and cordycepiamides A, B, C, and D (CA, CB, CC, and CD, respectively) in *Galleria mellonella* larvae at 3 and 4 days post injection with *Cordyceps militaris* blastospores. Vertical bars show standard errors.

держание кордицепина и кордицепиамида В связано с накоплением бластоспор в гемоцеле при развитии микоза. Об этом свидетельствует подъём концентрации данных соединений в зависимости от времени после инфицирования, а также более высокие их концентрации у непарализованных личинок.

Парализованные личинки характеризуются резко пониженной активностью инкапсуляции — одного из важнейших механизмов, направленных на инактивацию энтомопатогенных грибов [Butt et al., 2016], в том числе *C. militaris* [Kryukov et al., 2018]. С другой стороны, при инфекциях *C. militaris* и скармливания насекомым его культуральных фильтратов происходит ингибирование клеточного иммунитета [Kryukov et al., 2014]. Поэтому предполагается, что мажорный метаболит кордицепин способен подавлять клеточный иммунитет хозяев при патогенезах. Однако результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что кордицепин, видимо, не является индуцибельным токсином, то есть продуцируемым в ответ на иммунные реакции хозяина. Подъём концентрации кордицепина в парализованных личинках идёт с запаздыванием, но достигает почти того же уровня как в непарализованных насекомых к 4-м суткам после заражения. Также было показано, что кордицепин содержится в большем количестве в стромах гриба, чем в мумиях насекомых [Hur, 2008]. Для достижения инсектицидного действия или подавления развития воштинной огнёвки необходимы в сотни раз более высокие дозы [Kryukov, 2015], чем мы детектировали в насекомых в настоящей работе. Подобные результаты были получены в недавнем исследовании Ríos-Moreno [2017] при анализе содержания деструксина А (метаболита грибов *Metarhizium*) в личинках воштинной огнёвки. Однако, это не исключает локального подавления иммунитета кордицепином в местах, где происходит инкапсуляция гриба и выход патогена из капсул. Последующие исследования могут быть направлены на анализ вирулентности и иммунного ответа насекомых при заражении штаммами *C. militaris* с выключенными генами, определяющими синтез кордицепина. В частности, такие культуры получены в недавней работе Ксиа с соавт. [Xia et al., 2017].

Интересно, что детектированные в личинках кордицепиамиды А, В, С и D не обнаруживаются в культурах исследуемого изолята, выращенных на искусственных питательных средах (Берестецкий, Тюрин и др., неопубликованные данные). Вероятно, для запуска синтеза данных соединений необходим определённый состав питательного субстрата, характерный для гемолимфы воштинной огнёвки.

Работы, посвящённые биологической активности кордицепиамидов, единичны. Известно только, что они присутствуют в культурах *Cordyceps ninchukispora*, выращенных на рисе, при этом соединения А и В обладают противовоспалительной активностью в культуре клеток мышей RAW264.7 [Chang et al., 2017]. В то же время для ряда природных

и синтетических амидов показаны инсектицидные свойства [Siddiqui et al., 2005; Batista-Pereira et al., 2006], поэтому кордицепиамиды могут быть кандидатами для выделения и изучения их действия на насекомых.

Таким образом, это первое исследование по установлению физиологических концентраций кордицепина и его производных в насекомых в процессе развития микоза *C. militaris*. Динамика накопления данных веществ зависела от скорости колонизации гемоцеля, что обусловлено физиологическим состоянием насекомых.

## Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-34-50162-мол-нр. Постановка моделей патогенезов и содержание линий *H. hebetor* осуществлялась при поддержке РФФИ 18-04-00335 А. Авторы признательны Н.А. Крюковой, Е.А. Бунтовой и К.А. Можайцевой (ИСиЭЖ СО РАН) за ведение лабораторных линий насекомых.

## Литература

- Batista-Pereira L.G., Castral T.C., da Silva M.T., Amaral B.R., Fernandes J.B., Vieira P.C., da Silva M.F., Correa A.G. 2006. Insecticidal activity of synthetic amides on *Spodoptera frugiperda* // Zeitschrift für Naturforschung C. Vol.61. Nos 3–4. P.196–202.
- Butt T.M., Coates C.J., Dubovskiy I.M., Ratcliffe N.A. 2016. Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions // Advances in Genetics. Vol.94. P.307–364.
- Chang H.S., Cheng M.J., Wu M.D., Chan H.Y., Hsieh S.Y., Lin C.H., Yeh Y.J., Chen I.S. 2017. Secondary metabolites produced by an endophytic fungus *Cordyceps ninchukispora* from the seeds of *Beilschmiedia erythrophloia* Hayata // Phytochemistry Letters. Vol.22. P.179–184.
- Holliday J., Cleaver M. 2008. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A review // International Journal of Medicinal Mushrooms. Vol.10. No.3. P.219–234.
- Hur H. 2008. Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris* // Mycobiology. Vol.36. No.4. P.233–235.
- Kamata N. 2000. Population dynamics of the beech caterpillar, *Syntypistis punctatella*, and biotic and abiotic factors // Population Ecology. Vol.42. No.3. P.267–278.
- Kim J.R., Yeon S.H., Kim H.S., Ahn Y.J. 2002. Larvicidal activity against *Plutellaxylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris* // Pest Management Science. Vol.58. No.7. P.713–717.
- Kryukov V.Yu. 2015. Adaptation of entomopathogenic ascomycetes (Ascomycota, Hypocreales) to insect hosts and environmental factors in continental climate of Western Siberia and Kazakhstan. Doctoral dissertation. Novosibirsk. P.249. [In Russian].
- Kryukov V.Yu., Tomilova O.G., Yaroslavtseva O.N., Wen T.C., Kryukova N. A., Polenogova O.V., Tokarev Y.S., Glupov V.V. 2018. Temperature adaptations of *Cordyceps militaris*, impact of host thermal biology and immunity on mycosis development // Fungal Ecology. Vol. 35. P. 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.07.003>.
- Kryukov V.Yu., Yaroslavtseva O.N., Dubovskiy I.M., Tyurin M.V., Kryukova N.A., Glupov V.V. 2014. Insecticidal and immunosuppressive effect of ascomycete *Cordyceps militaris* on the Larvae of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // Biology Bulletin. Vol.41. No.3. P.276–283.

- Kryukov V.Yu., Yaroslavtseva O.N., Lednev G.R., Borisov B.A. 2011. Local epizootics caused by teleomorphic cordycipitoid fungi (Ascomycota: Hypocreales) in populations of forest lepidopterans and sawflies of the summer–autumn complex in Siberia // *Microbiology*. Vol.80. No.2. P.286–296.
- Kryukova N.A., Dubovskiy I.M., Chertkova E.A., Vorontsova Ya.L., Slepneva I.A., Glupov V.V. 2011. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae // *Journal of Insect Physiology*. Vol.57. No.6. P.796–800.
- Paterson R.R. M. 2008. *Cordyceps* — a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? // *Phytochemistry*. Vol.69. No.7. P.1469–1495.
- Rios-Moreno A., Garrido-Jurado I., Raya-Ortega M.C., Quesada-Moraga E. 2017. Quantification of fungal growth and destruxin A during infection of *Galleria mellonella* larvae by *Metarhizium brunneum* // *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.149. P.9–35.
- Roberts D.W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi // Burges H.D. (Ed.): *Microbial Control of Pests and Plant Disease 1970–1980*. London: Academic Press. P.441–463.
- Siddiqui B. S., Gulzar T., Begum S., Afshan F., Sattar F.A. 2005. Insecticidal amides from fruits of *Piper nigrum* Linn. // *Natural Product Letters*. Vol.19 No.2. P.143–150.
- Tomilova O.G., Kryukov V.Yu., Duisembekov B.A., Yaroslavtseva O.N., Tyurin M.V., Kryukova N.A., Skorokhodov V., Dubovskiy I.M., Glupov V.V. 2016. Immunophysiological aspects of synergy between avermectins and the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* in Colorado potato beetle larvae // *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.140. P.8–15.
- Tuli H.S., Sharma A.K., Sandhu S.S., Kashyap D. 2013. Cordycepin: A bioactive metabolite with therapeutic potential // *Life sciences*. Vol.93. P.863–869.
- Xia Y., Luo F., Shang Y., Chen P., Lu Y., and Wang C. 2017. Fungal Cordycepin Biosynthesis Is Coupled with the Production of the Safeguard Molecule Pentostatin // *Cell Chemical Biology*. Vol.24. P.1–11.

Поступила в редакцию 11.8.2018