

Ааре КУУЗИК, Лууле МЕТСПАЛУ, Кюлли ХИЙЕСААР,
Аво КОГЕРМАН, Койт ЛЭЭТС, Ыйе ХАЛДРЕ, Тауно РЕЙМА

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОАКТИВНОСТИ АНАЛОГОВ ЮВЕНИЛЬНОГО ГОРМОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИХ ПРЯМОГО И КОСВЕННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ДЫХАТЕЛЬНЫЙ ОБМЕН ДИАПАУЗИРУЮЩИХ КУКОЛОК КАПУСТНОЙ БЕЛЯНКИ

Определение биологической активности новых синтезируемых аналогов ювенильного гормона (АЮГ или ювеноидов) является одной из важнейших задач при разработке гормональной борьбы с вредными насекомыми. Существует немало различных методов оценки ювенильно-гормональной активности АЮГ, среди которых наибольшее распространение получили морфогенетические тесты, основанные на морфологических эффектах, обнаруженных в развивающихся тканях во время последующей после обработки линьки. Обычно в основу морфологических биотестов берут размах аномалии, обнаруженной при метаморфозных линьках. При проведении этих тестов возникает, однако, немало трудностей. Максимальные и минимальные дозы часто дают большую вариабельность (асимптотический эффект), требуя большого числа подопытных особей, а круглогодичное выращивание тест-объектов из различных таксономических групп в лабораторных условиях делает работу трудоемкой. Кроме того, трудно достигнуть полной синхронизации развития и адекватного физиологического состояния насекомых, что усложняет учет «критических периодов» в онтогенезе насекомых, после которого может отмечаться резкое снижение чувствительности их к препаратам ЮГ. Надо учесть, что скорость метаболизма АЮГ (деградация) максимальна в те периоды, когда титр эндогенного ЮГ наиболее низок, возможно, из-за повышения активности ЮГ-специфичных эстераз (Sanburg и др., 1975).

Исходя из подобных сложностей, возникающих при биотестах, Г. Б. Стаал (Staal, 1977) отметил, что метод выявления активности АЮГ путем нанесения его на интактные насекомые в то время, когда титр эндогенного гормона низок, неприменим, так как при этом не устранено взаимодействие с эндогенным ЮГ. Г. Б. Стаал предложил метод субституции гормона вместо его добавления, который, однако, неприменим из-за трудностей, связанных с микрохирургическими операциями (аллатектомией).

Чтобы упростить испытание больших серий новых синтезированных потенциальных ювеноидов (на чешуекрылых), нами сделана попытка использовать предварительный отбор наиболее активных из них, с которыми следует продолжать исследования в первую очередь. Основой предварительного биотеста служит действие АЮГ на общий метаболизм (отраженный в потреблении кислорода) диапаузирующих куколок *Pieris brassicae*. Предполагается, что ЮГ как и АЮГ способны стиму-

ливать дыхательный обмен либо прямым путем, действуя на дыхательные ферменты, либо косвенно, стимулируя процессы роста и дифференциации тканей. Однако наблюдаемые обычно после гормональных обработок незначительные сдвиги интенсивности дыхания приписывались косвенному действию ЮГ и АЮГ. Резкое повышение уровня потребления кислорода у диапаузирующих куколок *Pieris brassicae* отмечено нами уже в течение первых суток после аппликации, а вторичное, более медленное повышение — через несколько недель после обработки. По срокам появления этих пиков и по степени подъемов дыхания можно судить об общей ювенильно-гормональной активности АЮГ.

Ниже приводятся результаты предварительного отбора методом «диапаузного теста» наиболее активных из 26 потенциальных аналогов ЮГ, синтезированных в Институте химии АН Эстонской ССР. Обсуждаются причины резкого и постепенного подъемов уровня общего метаболизма у диапаузирующих куколок *Pieris brassicae* в результате аппликации АЮГ с точки зрения современных концепций о гормональной регуляции куколочной диапаузы.

Материал и методика

Для получения гусениц капустной белянки с кочанов капусты собирались яйцекладки, которые затем содержались в термокамере для инкубации. Вышедшие из яиц гусеницы (второе поколение) выращивались в термостатах — в начале при режиме длинного дня, а начиная с предпоследнего возраста — в условиях короткого фотопериода. Известно, что детерминация куколочной диапаузы у капустной белянки происходит во время двух последних возрастов.

В каждой опытной серии были использованы куколки из одной и той же яйцекладки, что обеспечило наибольшую синхронность развития и адекватность физиологического состояния. В течение 5—6 дней после образования куколок наступала диапауза и уровень дыхательного обмена понижался до $50 \text{ мм}^3 \text{ O}_2/2/ч$. Куколки для биотестов содержались при температуре 18—22°C, чтобы избежать холодовой реактивации. В каждой тест-серии были использованы куколки с более или менее одинаковым уровнем дыхания (общий размах вариации не превышал 15% от среднего значения). Во время глубокой диапаузы уровень дыхания куколок капустной белянки поддерживается в пределах 15—50 $\text{мм}^3 \text{ O}_2/2/ч$. Пораженный болезнями подопытный материал не пригоден для диапаузного теста, так как в таком случае у куколок не формируется глубокая диапауза, и в первой половине зимы уровень газообмена у них постепенно поднимается выше 100 $\text{мм}^3 \text{ O}_2/2/ч$.

Были испытаны три способа гормональной обработки: инъекция, вазелиновая маска ювеноида (на прокол кутикулы) и поверхностная аппликация. Первый способ оказал наибольшее влияние на дыхательный обмен, но возможный раневый метаболизм мог стать мешающим фактором. Основным способом обработки поэтому была использована поверхностная аппликация, проведенная в области первой и второй мягкой сочленовой мембраны брюшка, где кутикула наиболее тонкая. Растворенный в этаноле ювеноид (1:25) наносили на мягкую мембрану площадью 2 мм^2 в общем количестве 0,3 $\mu\text{л}$. Ацетон в качестве растворителей не применяли, так как он способен вызывать в первые дни после аппликации некоторый временный подъем дыхательного обмена, хотя и не обладает реактивирующим действием.

Для определения потребления кислорода применялись электронные регистрирующие (самопишущие) респирометры, функционирующие по

принципу микрокомпенсации кислорода путем электролиза в насыщенном растворе CuSO_4 (Куузик, 1977). В данном варианте конструкция респирометров была упрощена: электроды и фотодиод были объединены в единую электрическую цепь, питающуюся от аккумуляторной батареи (9 В). Потребление кислорода определяли при температуре 20°. Исходя из электролитического эквивалента кислорода, 1 мА тока генерирует за 1 ч 208,7 мм³ O₂, что и было взято за основу при градуировке шкалы самопишущих миллиамперметров (или милливольтметров) в единицу объема расходуемого кислорода (мм³ O₂/ч). Поскольку упомянутый респирометр регистрирует также ритмы диффузного газообмена и активной (или пассивной) вентиляции, то при значительных амплитудах этих ритмов было трудно определить средний уровень газообмена. В таком случае был последовательно включен электролитический интегратор (типа Х603), предназначенный для интегрирования во времени слабых токов, или же специальный электронный интегратор. Термостатом служил литровый термос с широким горлом (крышка вырезана из толстого поролона). Незначительные колебания температуры в термосе ($\pm 0,2^\circ$) не вызывали методической ошибки. Кроме того, применялись дифференциальные манометрические респирометры с регулируемыми объемами рабочей и компенсационной камер, изготовленных из оргстекла.

Для прослеживания процесса реактивации по циклам выделения CO₂ применялся газовый хроматограф, приспособленный для физиологических экспериментов (Куузик, 1976; Куузик, Когерман, 1978). С этой же целью был применен метод регистрации ритмов деятельности сердца (кардиограммы) (Куузик, Когерман, 1979).

Результаты

Характерным действием АЮГ было повышение уровня дыхательного обмена, которое наблюдалось дважды. Первый и к тому же более резкий подъем газообмена отмечен обычно на второй-третий день после аппликации, но поскольку это был резкий и кратковременный пик, то его максимум и точное время появления удалось установить только

Время появления I и II максимума дыхательного обмена под действием различных АЮГ, и степень подъема дыхания от первоначального уровня, %

Название АЮГ	I подъем		II подъем	
	Дни	%	Дни	%
Альтозар (ИХ АН ЭССР)	2	262	15	718
АЮГ-1978/4 (ИХ АН ЭССР)	4	265	15	509
АЮГ-1978/5 (ИХ АН ЭССР)	3	350	13	228
АЮГ-1979/4 (ИХ АН ЭССР)	3	340	15	817
АЮГ-1979/3 (ИХ АН ЭССР)	4	353	10	486
АЮГ-1979/6 (ИХ АН ЭССР)	2	205	20	702
АЮГ-1979/5 (ИХ АН ЭССР)	3	433	16	603
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир гераниола	2	168	15	205
<i>n</i> -Тимилловый эфир гераниола	2	200	18	280
Тимилметилловый эфир гераниола	2	268	15	306
АЮГ-1979/7 (ИХ АН ЭССР)	6	302	21	547
<i>n</i> -Крезилловый эфир метилгераниола	4	243	18	289
<i>m</i> -Крезилловый эфир метилгераниола	2	185	14	184

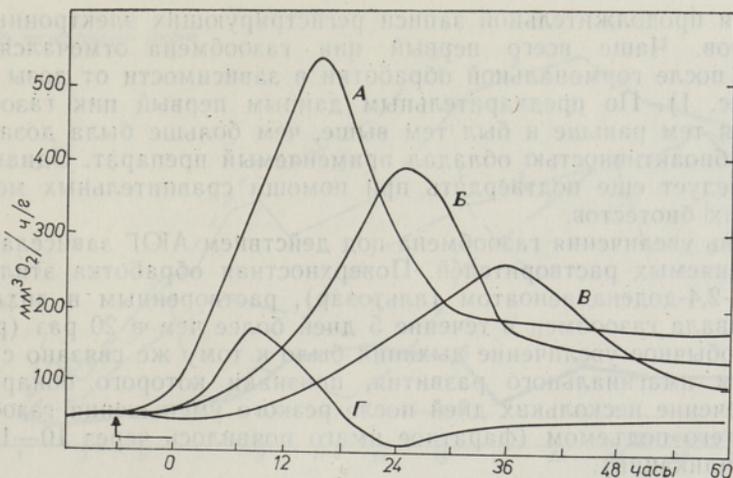


Рис. 1. Действие разных концентраций альтозара, разведенного в этаноле (0,3 мкл/особь): А — 1:5, Б — 1:10, В — 1:25, Г — ацетон в дозе 0,3 мкл/особь.

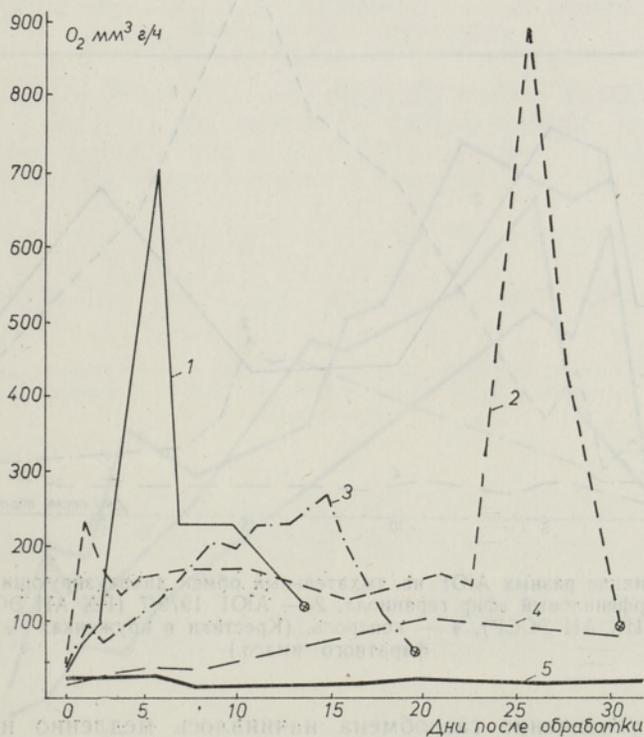


Рис. 2. Действие альтозара с различными растворителями на дыхательный обмен куколок. 1 — оливковое масло, 2 — дихлорэтан, 3 — ацетон, 4 — контроль на дихлорэтан, 5 — контроль без обработки. (Крестики в кружочках — появление фататного имаго.)

благодаря продолжительной записи регистрирующих электронных респирометров. Чаще всего первый пик газообмена отмечался через 20—40 ч после гормональной обработки в зависимости от дозы препарата (рис. 1). По предварительным данным первый пик газообмена появлялся тем раньше и был тем выше, чем больше была доза и чем большей биоактивностью обладал применяемый препарат. Однако этот вывод следует еще подтвердить при помощи сравнительных морфогенетических биотестов.

Степень увеличения газообмена под действием АЮГ зависела также от применяемых растворителей. Поверхностная обработка этил-3,7,11-триметил-2,4-додекадиеноатом (альтозар), растворенным в дихлорэтане, усиливала газообмен в течение 5 дней более чем в 20 раз (рис. 2). Такое необычное увеличение дыхания было к тому же связано с возобновлением имагинального развития, признаки которого обнаруживались в течение нескольких дней после резкого уменьшения газообмена вслед за его подъемом (фаратное имаго появилось через 10—12 дней после аппликации).

После первого резкого увеличения газообмена наблюдалось столь же резкое его уменьшение, причем уровень его обычно не падал ниже исходного уровня газообмена, характеризующего диапаузное состояние куколок (рис. 3, 4).

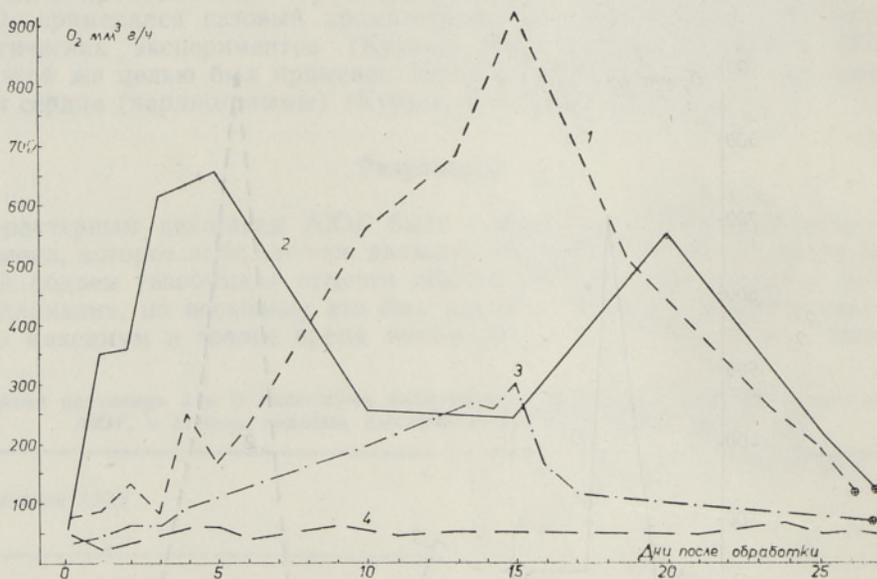


Рис. 3. Влияние разных АЮГ на дыхательный обмен диапаузирующих куколок. 1 — *p*-хлорфениловый эфир гераниола, 2 — АЮГ 1979/7 (ИХ АН ЭССР), 3 — альтозар (ИХ АН ЭССР), 4 — контроль. (Крестики в кружочках — появление фаратного имаго.)

Второе увеличение газообмена начиналось медленно и достигало максимума через 2—5 недель после аппликации. Чем раньше был отмечен второй пик газообмена, тем раньше начиналось имагинальное развитие, которое, однако, всегда прекращалось на стадии фаратного имаго. Таким образом, по респирометрическим измерениям можно было определить начало гистогенеза, причем о степени ювенильно-гормо-

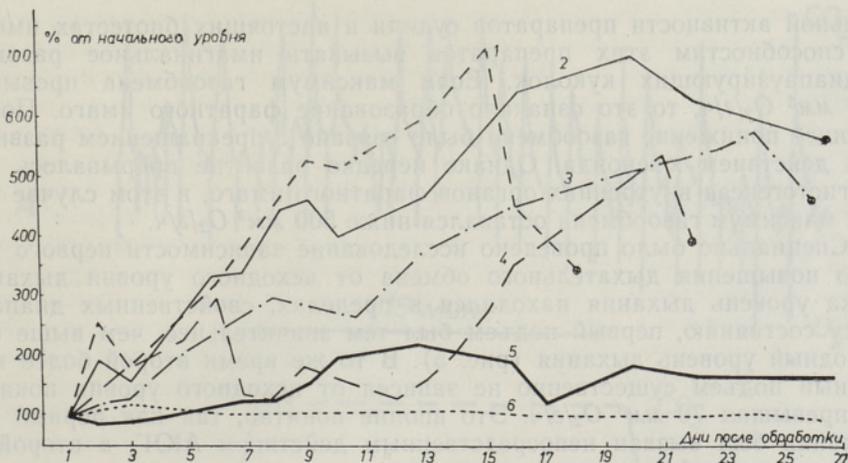


Рис. 4. Влияние разных АЮГ на дыхательный обмен диапаузирующих куколок. 1 — альтозар (ИХ АН ЭССР), 2 — АЮГ 1979/6 (ИХ АН ЭССР), 3 — АЮГ 1978/4 (ИХ АН ЭССР), 4 — крезильовый эфир гераниола, 5 — АЮГ 1978/5 (ИХ АН ЭССР), 6 — контроль.

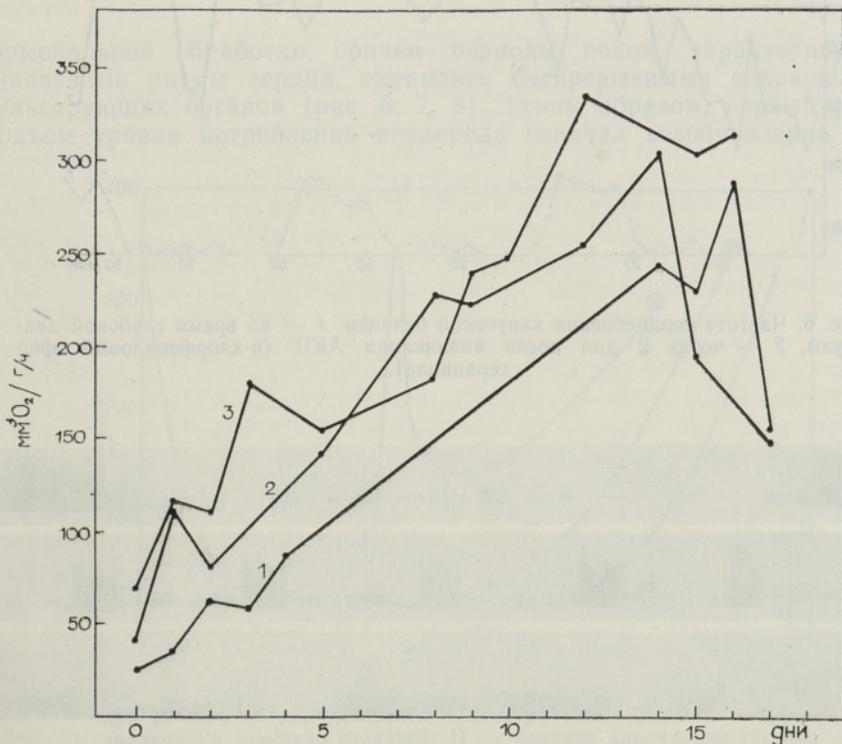


Рис. 5. Действие альтозара на дыхательный обмен куколок с различными исходными уровнями дыхания. 1 — 27 мм³ O₂/г/ч, 2 — 42 мм³ O₂/г/ч, 3 — 68 мм³ O₂/г/ч.

нальной активности препаратов судили в настоящих биотестах именно по способностям этих препаратов вызывать имагинальное развитие у диапаузирующих куколок. Если максимум газообмена превышал $500 \text{ мм}^3 \text{ O}_2/\text{г}/\text{ч}$, то это означало образование фартатного имаго. Последующее понижение газообмена было связано с прекращением развития под действием ювеноида. Однако нередко развитие прерывалось еще до гистогенеза внутренних органов фартатного имаго, в этом случае второй максимум газообмена оставался ниже $500 \text{ мм}^3 \text{ O}_2/\text{г}/\text{ч}$.

Специально было проведено исследование зависимости первого резкого повышения дыхательного обмена от исходного уровня дыхания. Пока уровень дыхания находился в пределах, свойственных диапаузирующему состоянию, первый подъем был тем значительнее, чем выше был исходный уровень дыхания (рис. 5). В то же время второй более медленный подъем существенно не зависел от исходного уровня пока он не превышал $70 \text{ мм}^3 \text{ O}_2/\text{г}/\text{ч}$. Это вполне понятно, так как первый пик дыхания был вызван непосредственным действием АЮГ, а второй — косвенным морфологическим влиянием его.

Вместе с повышением уровня общего обмена было отмечено также ускорение ритмов сердечной деятельности. Активные АЮГ вызывали заметное учащение ритмов сердца уже в течение первых дней после

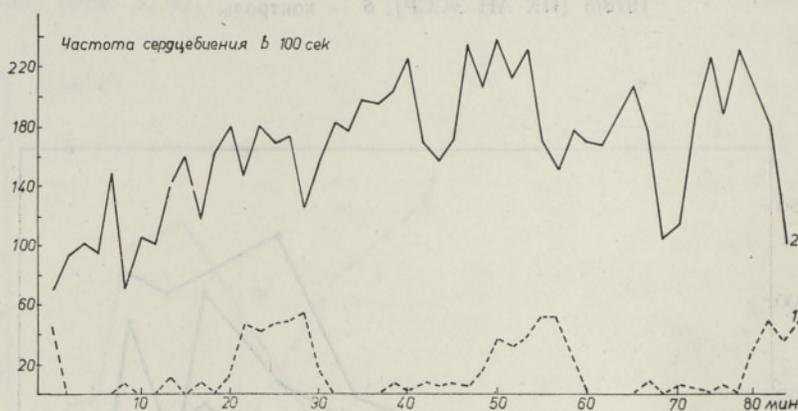


Рис. 6. Частота сердцебиения капустной белянки. 1 — во время глубокой диапаузы, 2 — через 2 дня после аппликации АЮГ (*п*-хлорфениловый эфир гераниола).

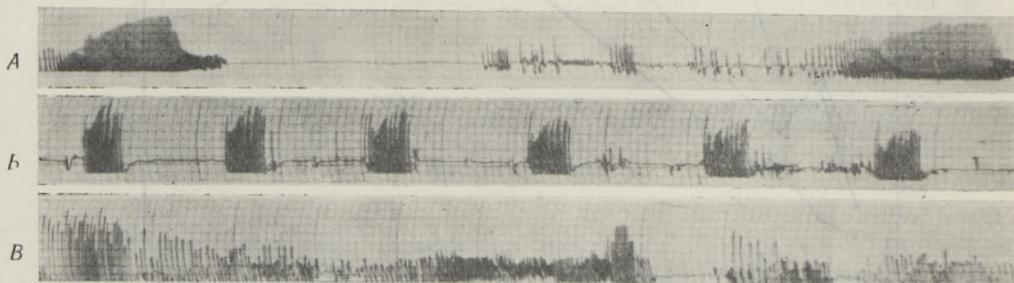


Рис. 7. Ритмы сердца у диапаузирующих куколок в виде кардиограмм (одно деление — 10 сек). А — начальная фаза диапаузы с длительными перерывами — периодами покоя, Б — через сутки после гормональной обработки, В — возобновление активного ритма через 3 сут после обработки.

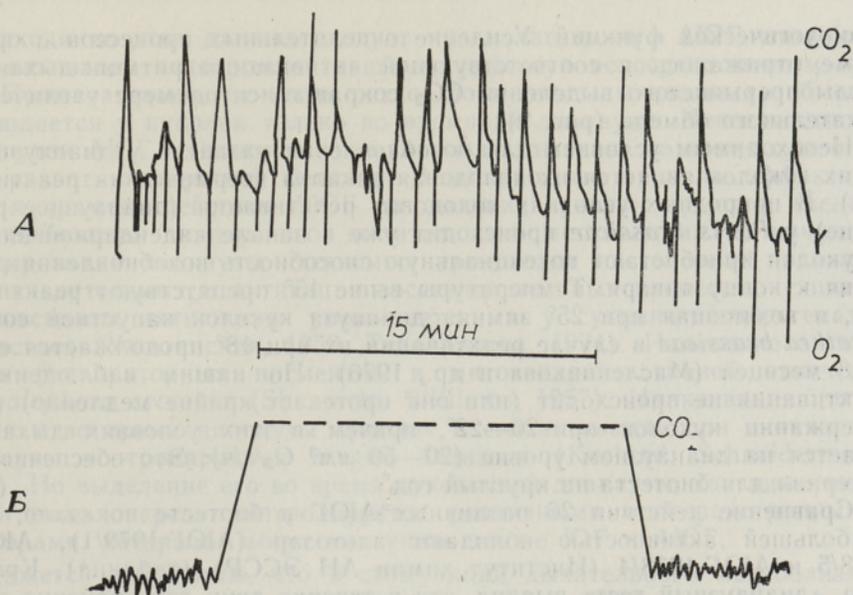


Рис 8. Ритмы выделения CO_2 у куколок капустной белянки. А — микроритмы газообмена во время глубокой диапаузы, чередующиеся с резкими пиками выделения CO_2 , Б — микроритмы у той же куколки в том же масштабе через 10 дней после аппликации АЮГ, вызывающим быструю реакцию (большие пики выделения CO_2 отсутствуют).

гормональной обработки, причем периоды покоя, характеризующие диапаузные ритмы сердца, сменились непрерывными сокращениями пульсирующих органов (рис. 6, 7, 8). Таким образом, первый резкий подъем уровня потребления кислорода означал возобновление обще-

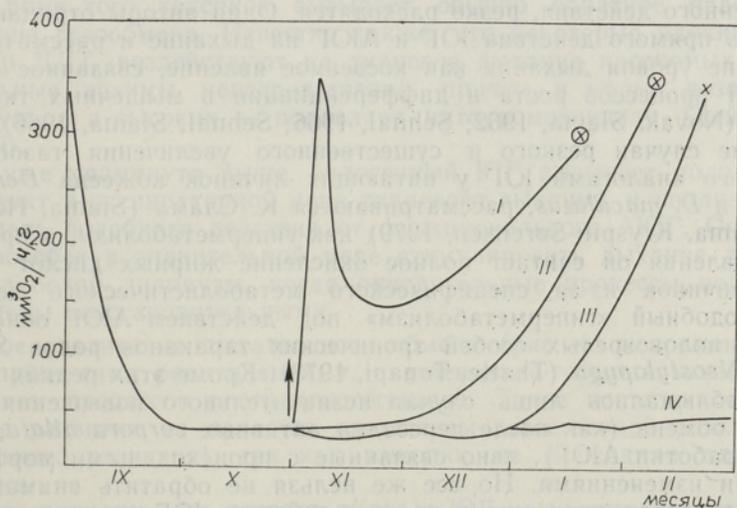


Рис 9. Изменение уровня дыхания у диапаузирующих куколок при 20°C . I — под действием альтозара ($0,25 \text{ мкг/особь}$); время аппликации отмечено стрелкой, II — влияние аппликации гусениц предпоследнего возраста, III — дыхание у куколок, пройденных холодovou закалку, IV — дыхание у куколок, содержащихся при $18-20^\circ\text{C}$. (Крестики в кружочках — появление фаратного имаго, крестик — вылет имаго).

физиологических функций. Усиление окислительных процессов в организме отражалось в соответствующей активизации ритмов дыхания; циклы прерывистого выделения CO_2 сокращались по мере увеличения дыхательного обмена (рис. 9).

Необходимым условием для возобновления развития у диапаузирующих куколок является их холодовая закалка (термическая реактивация). В природных условиях холодовая реактивация (диапаузное развитие) у *Pieris brassicae* происходит уже в начале календарной зимы, и куколки приобретают потенциальную способность возобновления развития к концу января. Температуры выше 15° препятствуют реактивации, и возникшая при 25° зимняя диапауза куколок капустной совки *Barathra brassicae* в случае реактивации их при 18° продолжается около 8 месяцев (Масленникова и др., 1976). По нашим наблюдениям, реактивация не происходит (или она протекает крайне медленно) при содержании куколок при $20-22^\circ$, причем в этих условиях дыхание остается на диапаузном уровне ($20-50 \text{ мм}^3 \text{ O}_2/\text{г}/\text{ч}$). Это обеспечивает материал для биотеста на круглый год.

Сравнение действия 26 различных АЮГ в биотесте показало, что наибольшей активностью обладают альтозар (АЮГ-1979/1), АЮГ-1978/5 и АЮГ-1978/4 (Институт химии АН ЭССР) (таблица). Кроме того, «диапаузный тест» выявил, что в течение двух лет хранения гормональная активность парахлорфенилгераниолового эфира существенно не уменьшалась, а при более длительном хранении качество его снижалось заметно.

Обсуждение результатов

Прежде всего возникает вопрос о причинах первого резкого подъема общего метаболизма в диапаузирующих куколках. Имеется немало данных о том, что гормон из *corpora allata* (ЮГ) стимулирует общий респираторный метаболизм. Однако мнения о том, является ли такой эффект ЮГ и его функциональных аналогов результатом прямого или же косвенного действия, резко расходятся. Одни авторы отрицают возможность прямого действия ЮГ и АЮГ на дыхание и рассматривают повышение уровня дыхания как косвенное явление, связанное со стимуляцией процессов роста и дифференциации в мышечных тканях и клетках (Novak, Slama, 1962; Sehnal, 1966; Sehnal, Slama, 1966).

Редкие случаи резкого и существенного увеличения газообмена, вызванного аналогами ЮГ у питающих личинок кожеда *Dermestes vulpinus* и *D. maculatus*, рассматриваются К. Слама (Slama, Hodkova, 1975; Slama, Kryspin-Sørensen, 1979) как гиперметаболизм, а причиной такого явления он считает полное окисление жирных кислот питающихся личинок из-за специфического метаболического действия АЮГ. Подобный «гиперметаболизм» под действием АЮГ обнаружен также у половозрелых особей тропических тараканов родов *Stilpnotabatta* и *Neostylopyga* (Thatte, Tonari, 1978). Кроме этих редких исключений наблюдались лишь случаи незначительного повышения дыхательного обмена (как после пересадки активных *corpora allata*, так и после обработки АЮГ), явно связанные с происходящими морфогенетическими изменениями. Но все же нельзя не обратить внимания на данные, свидетельствующие о прямом действии ЮГ на дыхательный обмен на уровне респираторных энзимов. Показано, что в гомогенате колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) ЮГ контролирует формирование АТФ, действуя в системе цитохром в митохондриях, причем ЮГ стимулирует оксидацию сукцината в дыхательной цепи (Stegwee, 1960; Wilde, Stegwee, 1958).

Исходя из этих данных следует предполагать, что АЮГ способствует активации цитохромной системы, действуя непосредственным путем. Примечательно, что столь резкое повышение дыхательного обмена наблюдается у куколок только во время их диапаузы. Непосредственным путем АЮГ не способен стимулировать дыхание во время гусеничного развития капустной белянки. Возможно, что причины эффективного и прямого действия АЮГ на дыхание куколок кроются именно в особенностях диапаузного дыхательного метаболизма. С началом формирования диапаузы насекомых происходит постепенное подавление окислительных и активация восстановительных процессов: у цитохромоксидазы активность уменьшается, а у сукцинатдегидрогеназы возрастает (Ушатинская, 1959; Тихонравова, 1974). Изменение активности респираторных пигментов в митохондриях тканей отмечено у *Hyalophora cecropia* (Shappirio, Williams, 1957). Инактивация цитохрома *c* во время диапаузы куколок и его активация при окончании диапаузы контролируются титром экдизона (Kurland, Schneiderman, 1959). Но выделение его во время куколочной диапаузы, как ниже видно, в свою очередь контролируется различными прототропными факторами, которыми могут выступать также ЮГ и АЮГ.

Кажется вероятным, что в стимуляции дыхательного метаболизма у диапаузирующих куколок участвуют как прямой, так и косвенный компоненты. Доказательством этого служат два подъема уровня дыхания (рис. 2, 3). Первый подъем, очевидно, обязан прямому воздействию, оказанному ювеноидом на дыхательные ферменты, причем такое явление может быть связано с процессами инактивации экзогенного вещества путем его метаболирования. Об этом может свидетельствовать последующий за подъемом постепенный спад интенсивности дыхания, который, однако, не опускается до исходного уровня, характеризующего состояние диапаузы. В то же время нет основания считать первоначальный быстрый рост газообмена обусловленным простым токсикозом, так как используемые дозы препарата АЮГ ничтожно малы. Кроме того, токсикоз вызывает обычно обратное явление — подавление газообмена. Известно также, что некоторые ядохимикаты, например ДДТ, воздействуют на тканевое дыхание насекомых, на их дыхательные ферменты непосредственно, причем в малых дозах ДДТ активирует, а в высоких — подавляет цитохромоксидазу (Хейнман и др., 1970).

Как уже упомянуто выше, эндогенный ЮГ вызывает положительный эффект в респираторной цепи тканевого дыхания, и вполне логично ожидать подобного действия от функционального АЮГ. Очевидно, АЮГ способен в значительной мере стимулировать дыхание лишь во время глубокой диапаузы, когда окислительные процессы подавлены и замещены восстановительными.

Второе увеличение дыхательного обмена (рис. 4) непременно связано с процессами реактивации, т. е. ювенильно-гормональным стимулированием процессов роста (гистогенеза). Такое постепенное возобновление развития не является следствием естественной реактивации (диапаузного развития), так как куколки не проходили холодной обработки.

Ранее считалось, что *corpora allata* и ЮГ не участвуют в контроле диапаузы и остаются полностью неактивными. Все же имеются данные, что в диапаузирующих куколках ЮГ сохраняется в незначительном количестве, а инактивируется этот гормон полностью только после холодной закалки (Gilbert, Schneiderman, 1961). Следует также учитывать возможность, что активность ЮГ- и АЮГ-специфических эсте-

раз изменяется в ходе холодной закалки. Наши опыты, однако, показали, что АЮГ оказывает одинаково прямое действие на газообмен как охлажденных (1 месяц при 0°), так и неохлажденных диапаузирующих куколок *Pieris brassicae*. Таким образом, возможное присутствие или отсутствие эндогенного ЮГ существенного значения при «диапаузном тесте» не имеет.

По общепринятой концепции, куколичная диапауза возникает в результате отсутствия активационного гормона (экдизиотропина), выделяемого из нейросекреторных клеток мозга. Действительной причиной диапаузы куколок является блокировка транспорта нейросекреторных гранул из нейросекреторных клеток мозга (Кинд, 1968), которое возникает в условиях короткого фотопериода в случае факультативной диапаузы. В ходе реактивации происходит деблокирование транспорта экдизиотропина. Однако имеются и другие факторы, способствующие завершению процессов реактивации. У куколок с удаленным мозгом развитие возобновляется после холодной обработки (Масленникова, 1972), что было приписано неизвестному фактору диапаузы. Уже классические опыты с шелкопрядом цекропии *Hyalophora cecropia* показали, что инъекция экстракта цекропиевого масла, содержащего ЮГ, прекращает диапаузу и вызывает развитие насекомых (Gilbert, Schneiderman, 1959). Утверждают, что ЮГ и АЮГ действуют в диапаузирующих куколках *Varathra brassicae* как проторакотропный фактор, который активирует проторакальные железы к выделению экдизона, последний же активирует нейросекреторные клетки мозга, секрет которого (активационный гормон) дополнительно стимулирует проторакальные железы. Очевидно, мозг не играет большой роли в устранении куколичной диапаузы под действием ЮГ (Hiruma и др., 1978; Hiruma, 1979).

При естественном формировании диапаузы куколок *Pieris brassicae* детерминация ее происходит во время двух последних возрастов гусеницы (Claret, 1966). Резкого критического периода терминации диапаузы нами не обнаружено, если использовать искусственную реактивацию (активацию проторакальных желез) под действием АЮГ. Даже аппликация во время предпоследнего возраста приводила к ослаблению диапаузы. Известно, однако, что у *Varathra brassicae* АЮГ способен активировать проторакальные железы лишь начиная с 5-дневного возраста гусеницы после последней ее линьки (Hiruma и др., 1978). Возможно, что длительное остаточное действие АЮГ, проходящее через последующие возрасты гусеницы и проявляющееся на стадии куколки, обязано связыванию АЮГ с акцепторными белками, сохраняющими экзогенный ЮГ от быстрой деградаци. Роль таких протеинов выявлена в циклах активности эндогенного ЮГ (Nowock и др., 1976).

Из приведенного следует, что АЮГ способен выступать в роли экдизиотропного фактора и совершать реактивацию диапаузы, минуя реактивационные центры мозга. Возобновлению гистогенеза в ходе реактивации сопутствует активизация окислительных процессов, что отражается на повышении уровня дыхательного обмена. Учитывая степень подъема потребления кислорода куколками при окончании диапаузы, вызванного различными АЮГ, можно произвести предварительную оценку ювенильно-гормональной активности испытанных препаратов. Более подробные первичные испытания наиболее перспективных препаратов можно провести по стандартным морфогенетическим биотестам.

Выводы

1. Аналоги ЮГ способны в значительной мере стимулировать дыхательный обмен во время куколочной диапаузы *Pieris brassicae*.
2. Обнаруживаются как прямое, так и косвенное действие ювеноида на дыхательный обмен, причем косвенное действие связано с возобновлением развития куколок.
3. Действие АЮГ на общий метаболизм, отраженное в потреблении кислорода, коррелирует с общей морфогенетической активностью аналогов и может быть использовано для предварительных оценок активности АЮГ.
4. Не обнаружено резкого критического периода при искусственной гормональной термации куколочной диапаузы под действием АЮГ, причем даже обработка предпоследнего возраста гусениц вызывала ослабление диапаузы, отраженное в повышении уровня дыхательного обмена.

ЛИТЕРАТУРА

- Кинд Г. В. Функциональная морфология нейросекреторных систем насекомых при активном развитии и при различных типах диапаузы. — В кн.: Фотопериодические адаптации у насекомых и клещей. Л., 1968, 153—191.
- Куузик А. Изучение цикличности газообмена у жуков (*Coleoptera*) при помощи постоянной записи газового хроматографа. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1976, 25, 97—105.
- Куузик А. Циклы газообмена у диапаузирующих куколок *Pieris brassicae* и *Pieris rapae* (*Lepidoptera*). — Изв. АН ЭССР. Биол., 1977, 26, 96—101.
- Куузик А., Когерман А. Аномалии в метаморфозе колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say), вызванные обработкой личинок последнего возраста аналогом ювенильного гормона. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1978, 27, 110—116.
- Куузик А. Э., Когерман А. Разнообразие эффектов, вызываемых аналогом ювенильного гормона у некоторых видов насекомых, и возможности их применения в практике. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1979, 28, 314—325.
- Масленникова В. А. О бифакториальном принципе регуляции куколочной диапаузы. — Тр. Петергофского биол. института, 1972, 21, 46—67.
- Масленникова В. А., Черныш С. И., Абдель Наби А. А. Титр экдизона при индукции зимней и летней диапаузы капустной совки (*Barathra brassicae* L., *Lepidoptera*, *Noctuidae*). — Энт. обзор., 1976, 55, 768—776.
- Тихонравова Н. М. Соотношение и смена аэробноза и анаэробноза в онтогенезе колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) и капустной белянки (*Pieris brassicae* L.). — В кн.: Вопросы экологической физиологии беспозвоночных. М., 1974, 45—81.
- Ушатинская Р. С. Активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы у колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* в преддиапаузный период и при наступлении диапаузы. — Докл. АН СССР, 1959, 3, 687—690.
- Хейнман В. А., Гар К. А., Попова Н. А. Окислительное фосфорилирование в митохондриях саранчи и влияние инсектицидов. — В кн.: Химические средства защиты растений. (Тр. ВНИИХСЗР), 1970, 1, 71—81.
- Claret, J. Mise en évidence du rôle photorécepteur du cerveau dans l'induction de la diapause, chez *Pieris brassicae*. — Ann. Endocrinol., 1966, 27, 311—320.
- Gilbert, L. J., Schneiderman, H. A. Prothoracic gland stimulation by juvenile hormone extracts of insects. — Nature (London), 1959, 184, 171—173.
- Gilbert, L., Schneiderman, H. The content of juvenile hormone and lipid in *Lepidoptera*: sexual differences and developmental changes. — Gen. Comp. Endocrinol., 1961, 1, 453—472.
- Hiruma, K. Prevention of pupal diapause by the application of juvenile hormone analogue t1 to the last instar larvae of *Mamestra brassicae*. — Appl. Entomol. Zool. 1979, 14, 76—82.
- Hiruma, K., Shimada, H., Yagi, S. Activation of the prothoracic gland hormone in *Mamestra brassicae*. — J. Insect Physiol., 1978, 24, 215—220.

- Kurland, Ch. G., Schneiderman, H. A. The respiratory enzymes of diapausing silkworm pupae: a new interpretation of carbon monoxide-insensitive respiration. — Biol. Bull. W. H., 1959, 136—161.
- Novák, V. J., Sláma, K. The influence of juvenile hormone on the oxygen consumption of the last larval instar of *Pyrhocris apterus* L. — J. Insect Physiol., 1962, 8, 145—153.
- Novock, J., Hammock, B., Gilbert, L. The binding protein as a modulator of juvenile hormone stability and uptake. — In: The juvenile hormones (Ed. by L. Gilbert), New York, 1976, 354—373.
- Sanburg, L., Kramer, K., Kezdy, F., Law, L. Juvenile hormone-specific esterases in the haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. — J. Insect Physiol., 1975, 21, 873—887.
- Sehnal, F. The influence of juvenile hormone on the oxygen consumption of *Galleria mellonella* L. larvae and pupae. — Acta ent. bohemoslov., 1966, 63, 258—265.
- Sehnal, F., Sláma, K. The effect of *corpus allatum* hormone on respiratory metabolism during larval development and metamorphosis of *Galleria mellonella* L. — J. Insect Physiol., 1966, 12, 1333—1342.
- Shapiro, D. G., Williams, C. M. The cytochrome system of cecropia silkworm II. Spectrophotometric studies of oxidative enzyme system in the wing epithelium. — Proc. Roy. Soc. B, 1957, 147, 233—246.
- Sláma, K., Hodkova, M. Insect hormones and bioanalogs: their effect on respiratory metabolism in *Dermestes vulpinus* L. (Coleoptera). — Biol. Bull. 1975, 148, 320—332.
- Sláma, K., Kryspin-Sørensen, I. Hypermetabolic response induced by juvenile hormone analogues in an insect. — Z. Naturforsch., 1979, C 34, 7—8, 599—607.
- Staal, G. B. Essential differences between natural juvenile hormones and juvenile hormone analogs elucidated by use of a substitution assay. — In: Sem. etude theme prod. nat. et prot. plant., 1977, 333—348.
- Stegwee, D. Metabolic effect of a *corpus allatum* hormone in diapausing *Leptinotarsa decemlineata* Say. — In: Proc. 11th Intern. Congr. Entomol., 1960, 218—221.
- Thatte, S. J., Tonapi, G. T. Effect of JH analogues on the rate of metabolism in the adult cockroaches. — Indian J. Exp. Biol., 1978, 16, 1008—1010.
- Wilde, J., Stegwee, D. The major effects of the *corpus allatum* in the adult Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). — Arch. nierl. Zool., 1958, 13, 277—289.

Институт зоологии и ботаники
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
14/XI 1979

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Aare KUUSIK, Luule METSPALU, Külli HIIESAAR, Avo KOGERMAN,
Koit LÄATS, Oie HALDRE, Tauno REIMA

JUVENILHORMOONI ANALOOGIDE VAHETU JA KAUDNE MOJU SUUR-KAPSALIBLIKA DIAPAUSEERUVATE NUKKUDE HINGAMIS- AINEVAHETUSELE NING SEL PÕHINEV BIOTESTIMEETOD

Juveniilhormooni analoogide (JHA) toimel esineb suurrakapsaliblika *Pieris brassicae* L. diapauseeruvate nukkude hingamisainevahetuses kaks hapnikutarbimise tõusu. Neist esimene on järsk ja ilmub juba esimesel ööpäeval pärast pindmist töötlust JHA-ga; doosist ja preparaadi üldisest morfoloogilisest aktiivsusest sõltuvalt võib see olla kuni 20-kordne. Eeldatavasti on tegu JHA vahetu toimega hingamisensüümidele. Hapnikutarbimise teine tõus on aeglane, vaieldamatult on see seotud morfogeneesi protsesside stimuleerimisega JHA poolt. JHA esineb protorakaalnäärmete aktivaatorina, ta reaktiveerib diapausi sõltumatult ajuhormoonist.

Ülalkirjeldatule tuginedes on autorid välja töötanud uue JHA esmase katsetamise kiirmeetodi, mis on võimeline tunduvalt tõhustama uute juvenoidide sünteesi.

Aare KUUSIK, Luule METSPALU, Külli HIIESAAR, Avo KOGERMAN,
Koit LÄÄTS, Oie HALDRE, Tauno REIMA

AN ASSAY FOR JUVENILE HORMONE ANALOGS BASED ON THEIR DIRECT AND INDIRECT EFFECTS REVEALED IN THE RESPIRATORY METABOLISM IN DIAPAUSING PUPAE OF *PIERIS BRASSICAE* (LEPIDOPTERA, PIERIDAE)

The authors propose a comparative bioassay method for juvenile hormone analogs (JHA) measuring the respiratory response in the diapausing pupae of *Pieris brassicae*. In all cases topical applications in ethanol (concentration 1:25) was used. Treatments were performed on the thin connecting intersegmental membrane of pupal abdomen using doses of 0.3 g per g of living weight.

Treatment with relatively highly active JHA caused enormous increase in respiratory metabolism. After a steep rise in O_2 consumption, noticed in several days after treatment, there followed a moderate fall in metabolic activity (Fig. 3, 4). After the first steep peak in O_2 consumption there occurred a second slow but continuous rise in respiratory metabolism. It is suggested that JHA has a direct and general stimulating effect on the metabolic activity by activating the respiratory enzymes in diapausing pupae for some time. The second slow rise in metabolic rate was found to be an indirect effect of JHA on total metabolism by inducing growth and physiological changes in developing tissues.

The treated pupae developed into pharate imagos, but normal ecdysis was never observed. The first steep increase in the rate of respiration depended upon the solvents and juvenoid doses. An extraordinary effect on the respiratory metabolism was exerted by such solvents as dichlorethan, in which case the oxygen consumption rose within some days from 22 mm³O₂/g/h to 800–900 mm³ O₂/g/h (Fig. 2). The exact time of appearance of the first peak in respiratory metabolism was established by means of a recording electronic respirometer. The changes in the cyclicity of CO₂ release were also examined by means of continuous registration by gas chromatography. For diapausing pupae, a discontinuous respiration is typical, when the cyclic release of CO₂ at 20° is followed by intervals of 1–3 hours. Within a few days after the juvenoid treatment there was revealed an essential change in the rhythm of gas exchange. First a rise in the frequency of CO₂ bursts was observed, and then the great cycles of CO₂ output were substituted by microcycles (Fig. 8). Such microcycles are characteristic of the developing pupae after the process of reactivation.

The influence of juvenoid on the cardiac rhythm was likewise investigated in the diapausing pupae. The number of systoles per 100 sec before and after application was registered by a pulse recorder. In a diapausing pupae the degree of oxygen consumption was 15–60 mm³ O₂/g/h, and in this period of time the heart beats stopped periodically (Fig. 6) while in the alternating active periods the heart rate per 100 sec was about 40–50 beats. After the juvenoid treatment the cardiac rhythm was changed within some days, when the stopping periods disappeared. At the same time a significant increase in the frequency of systoles was noticed (Fig. 7).

Obviously the basic physiological functions of the diapausing pupae were temporarily restored already within some days after treatment, as concluded from the above-mentioned changes in the cyclicity of the respiratory metabolism and in cardiac rhythm. Present experiments revealed that the observed rises in O₂ consumption were closely correlated with the degree of general morphogenetic activity of JHA. Thus the diapausing pupae may be used as subjects for comparative tests of JHA measuring the degree of O₂ consumption. The described assay is regarded as a provisional test for selecting the most active compounds from a series of potential juvenoids. The «diapause test» would be followed by a detailed epidermic test with the more promising compounds selected.