

## Влияние вторичных метаболитов *Juniperus sabina* L. (Cupressaceae) на выживаемость и питание *Galleria mellonella* L. (Pyralidae)

Д. С. ЕЛИСОВЕЦКАЯ<sup>1</sup>, Я. БРИНДЗА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт генетики, физиологии и защиты растений АНМ  
МД-2002, Кишинэу, Пэдурий 20  
E-mail: dina.elis.s@gmail.com

<sup>2</sup> Словацкий аграрный университет в Нитре  
949 76, Нитра ул. А. Хилинку, 2  
E-mail: brindza.jan@gmail.com

Статья поступила 02.03.2018

Принята к печати 03.04.2018

### АННОТАЦИЯ

Изучено влияние спиртового экстракта и эфирного масла из растения *Juniperus sabina* L. (Cupressaceae) на выживаемость и питание гусениц *Galleria mellonella* L. (Pyralidae). Установлено, что эфирное масло обладает инсектицидными, антифидантными, детеррентными и репеллентными свойствами. Гибель гусениц при топикальном нанесении 0,2 мкл эфирного масла на дорзальную область (контактное действие) достигает 64,0 %. Питание гусениц кормом, обработанным эфирным маслом из *J. sabina* (200 мкл эфирного масла на 1,5 г корма), снижается в 2,1 раза в сравнении с контролем. Показано, что гусеницы *G. mellonella* в течение 14 дней избегают питаться кормом, обработанным эфирным маслом, и при посадке в чашки Петри активно движутся в противоположном от обработанного корма направлении. Установлено, что пары эфирного масла *J. sabina* подавляют развитие гусениц галлерии даже при их питании необработанным кормом – наблюдается отставание массы тела и задержка линьки в следующий возраст. Эфирное масло данного растения проявляет также умеренную токсичность (20,0 %) при поедании гусеницами обработанного корма, т. е. обладает кишечным действием. Спиртовой экстракт *J. sabina* в концентрации 2,5 % действующих веществ (по сухому остатку) незначительно влияет на гибель гусениц при обработке корма (10,0 % контактное). При топикальном нанесении на дорзальную область экстракт вызывает 20%-ю гибель насекомых. Антифидантные и репеллентные свойства по отношению к гусеницам спиртовой экстракт растения не проявил, однако отмечен невысокий уровень детеррентной активности, выражающийся в подавлении формирования и развития куколок *Galleria mellonella*. Эфирное масло снижало процент окуклившихся гусениц и вылетевших имаго в 3 раза, а массу гусениц на 40,7–48,0 % по сравнению с контролем.

**Ключевые слова:** экстракт, эфирное масло, *Juniperus sabina*, репеллент, антифидант, инсектицид, детеррент.

Вторичные метаболиты растений привлекают внимание специалистов различных областей из-за широких возможностей их при-

менения при щадящем воздействии на окружающую среду. Являясь продуктами жизнедеятельности самих растений, природные

биологически активные соединения обладают рядом уникальных преимуществ перед синтетическими веществами. С одной стороны, в результате естественного отбора самой природой синтезирован огромный ассортимент веществ с широким спектром биологической активности, с другой стороны – растительные вторичные метаболиты чаще всего обладают узкой направленностью и избирательностью действия. Эти свойства позволяют использовать природные растительные ресурсы не только в качестве источника пищи, но и для получения препаратов, обладающих антагонистической активностью против патогенов – вредителей и болезней. В связи с вышеизложенным, одним из современных направлений в экологическом земледелии является разработка биологических средств нового поколения для контроля вредных организмов, так называемых биопестицидов – препаратов на основе вторичных метаболитов растений.

Среди множества растений предпочтение отдают видам, нетоксичным или слаботоксичным по отношению к теплокровным, человеку, а также водным организмам (млекопитающим, рыбам, ракообразным и т. д.). Однако в то же время растения должны проявлять высокую активность по отношению к патогенам и накапливать достаточное количество биологически активных веществ, которое обеспечит наработку препаратов в промышленных масштабах. Среди семейств отдела Pinophyta (Coniferae) значительное количество видов отвечает вышеназванным условиям. Например, представители семейства Pinaceae – пихта *Abies* Mill., кедр *Cedrus* Trew, ель *Picea* A. Dietr., сосна *Pinus* L., лиственница *Larix* Mill. достаточно активно используются для получения биопрепаратов с росторегулирующими и иммуностимулирующими свойствами. В России зарегистрированы и запатентованы препараты на основе тритерпеновых кислот, выделенных из хвои пихты сибирской *Abies sibirica* Ledeb., 1983, также препараты из древесной зелени ели (*Picea obovata* Ledeb., 1983), из древесины лиственницы (*Larix sibirica* Ledeb., 1983) – “Биосид”, “Силк”, “Новосил”, “Срезар”, “Лариксин”, “Растстим”, “Силбиол”, “Вэрва” и некоторые другие, которые относятся к фунгицидам, бактериоцидам, вирулици-

дам, регуляторам роста и индукторам иммунитета растений к комплексу болезней [Хуршайнен и др., 2007, 2011; Граскова, 2009]. В настоящее время налажено заводское производство данных препаратов [Евтушенко и др., 2008; Широких, 2008].

В древесной зелени растений семейства Pinaceae содержатся такие фенольные соединения, как ацетофеноны, гидроксibenзойные и гидроксикоричные кислоты, флавоноиды и стильбены, которые обладают не только высокой активностью по отношению к ряду вирусов, грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам, патогенным грибам, ростостимулирующим действием на растения, но также проявляют и инсектицидные и репеллентные свойства против вредных видов насекомых [Васильев и др., 1996; Артемкина и др., 2004].

В Молдове такие представители хвойных, как пихты, сосны, ели, произрастают в основном в декоративных парках. Порядка 16 таких парков взяты под государственную охрану, среди которых самый крупный Цаульский, основанный в 1901 г., находится на севере Молдавии и занимает площадь около 50 га. В Молдове имеются и другие парки – Кугурештский и Брынзенский на севере, Иванча и Милештский в центре, Хырбовецкий и Леонтьевский на юге. В них растет 31 вид хвойных и 55 видов лиственных деревьев, завезенных сюда из-за рубежа более полувека назад. Они хорошо приспособились к молдавскому климату и почве и стали привычными в местной флоре. Однако сбор растительного сырья данных видов растений в промышленных масштабах существенно затруднен. Поэтому исследовано такое неприхотливое растение семейства Cupressaceae (Кипарисовые) как можжевельник казацкий *Juniperus sabina* L. Он по предварительным оценкам [Елисоветская и др., 2015] в Молдове в разных районах, парках, заповедниках занимает небольшие площади в среднем примерно по полгектара. Однако преимущество растений *J. sabina* заключается в том, что его кусты достаточно быстро разрастаются в ширину, поэтому требуют ежегодной обрезки. Ранее проводились предварительные расчеты и установлено, что в результате ежегодной обрезки растений можжевельника казацкого, произрастающего только на

территории Ботанического сада и двух питомников (Яргара и Теленешты) получается сырье препарата, которого хватает для обработки примерно 10–12 га картофеля. Существует возможность увеличения рассчитанного количества получаемого сырья минимум в 1,5–2 раза за счет других площадей (заповедник Лозова; с. Кишкарень, р-н Сынжерей). Кроме того, вид *J. sabina* считается перспективным для высаживания вдоль дорог на крутых склонах для сдерживания оползней. Таким образом, для получения биопестицидов для внутреннего рынка Республики Молдова на первое время ресурсов растения вполне достаточно.

Цель настоящей работы – изучение влияния вторичных метаболитов из растительного экстракта и эфирного масла из можжевельника казацкого *Juniperus sabina* L. (Cupressaceae) на выживаемость и питание *Galleria mellonella* L. (Pyralidae).

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования, представленные в данной работе, проведены на базе лабораторий “Интегрированная защита растений” Института генетики, физиологии и защиты растений Академии наук Молдовы (ИГФЗР АНМ), а также на базе Института сохранения биоразнообразия и биологической безопасности, факультета агробиологии продовольственных ресурсов Словацкого аграрного университета в Нитре.

Объектом исследований служили растительный экстракт и эфирное масло, полученные из растения вида *Juniperus sabina* L. (Cupressaceae), произрастающего в Центральной зоне Республики Молдова. Растения собраны во второй декаде мая 2017 г. (координаты сбора 46°57'44,3" с. ш., 28°53'16,9" в. д.) путем обрезки 30–50 см отросших боковых ветвей в соответствии с методами, принятыми в ботанических и биохимических исследованиях. Идентификация растения *Juniperus sabina* проведена с помощью специалистов Ботанического сада Института АНМ и Института исследований и менеджмента лесных насаждений, Кишинэу [Elisovetskaya et al., 2014].

Собранный растительный материал подвергали сушке при температуре 28–30 °С в

хорошо проветриваемом помещении вдали от прямых лучей солнца до содержания гигроскопической влаги 11–12 % согласно стандартной методике [Маркова и др., 2003]. Высушенное растительное сырье измельчали на электрической лабораторной мельнице (тип МРП-1, асинхронный двигатель) в течение 2–3 мин и просеивали на сите с размером отверстий 2 мм. Измельченное растительное сырье хранили в темном месте при температуре воздуха 20–22 °С.

Влажность ( $W$ ) растительного сырья определяли согласно стандартной методике (ОФС.1.5.3.0007.15) и вычисляли в процентах по формуле

$$W = \frac{(m - m_1) \times 100}{m}, \quad (1)$$

где  $W$  – влажность растительного сырья, %;  $m$  – масса до высушивания, г;  $m_1$  – масса после высушивания, г.

**Получение экстракта и эфирного масла для лабораторного тестирования.** В качестве растворителя использовали 96%-й этиловый спирт, позволяющий экстрагировать из растительного сырья максимальное количество классов биологически активных веществ [Хантургаев, 2003]. Измельченное растительное сырье заливали растворителем в соотношении 1 : 5 (сырье : растворитель). Смесь встряхивали в колбах Эрленмейера на лабораторном встряхивателе (LT 2, SKLO UNION, Чешская Республика) в течение 4 ч и настаивали 24 ч при температуре +24 (±2) °С. Затем экстракт отфильтровывали через бумажный фильтр на воронке Бюхнера под вакуумом и упаривали на роторном испарителе до полного удаления растворителя. Остаток растворяли в четырехкратном количестве 96%-го этилового спирта, в результате чего получали 20%-й (по сухому остатку) спиртовой раствор. Полученные экстракты хранили при температуре +4 °С.

Перед тестированием в лабораторных условиях 20%-е экстракты разбавляли дистиллированной водой до концентрации 2,5 % по сухому остатку. Содержание этилового спирта в рабочих растворах растительных экстрактов не превышало 12 %.

Кроме спиртового экстракта из растения *J. sabina* получали эфирное масло. Извлечение эфирного масла проводили методом гид-

родистилляции [Hesham et al., 2016] путем перегонки навески сырья (200 г для свежего и 100 г для сухого растения) с очищенной водой (в соотношении сырье : растворитель 1 : 6) в 1–2-литровой колбе с обратным холодильником. Эфирное масло собирали в подвешенный свободно в колбе приемник Гинсберга. После перегонки приемник извлекали, охлаждали на воздухе до комнатной температуры, отделяли эфирное масло с помощью микропипеток и количественно переносили его в мерные пробирки с ценой деления 0,02 мл. Колбу с содержимым нагревали на газовой плитке или электроплитке с закрытой спиралью и регулятором мощности нагрева и кипятили в течение 3 ч и более (до прекращения увеличения объема эфирного масла, определяемого визуально).

Содержание эфирного масла в массовых процентах ( $X$ ) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V \times 100 \times 100}{\alpha \times (100 - W)}, \quad (2)$$

где  $V$  – объем эфирного масла, мл;  $\alpha$  – навеска сырья или лекарственного растительного препарата, г;  $W$  – влажность, %.

Основными действующими веществами хвои *J. sabina* являются эфирное масло (сабиноль), состоящее из третичного спирта сабинола (от 10 до 50 %) и различных терпеновых соединений (до 30 % состава): сабинена, сабинолацетата (50 %),  $\alpha$ -пинена, кадинена, борнеола, цитронеллола, гераниола, кадинена, дегидрокуминового спирта,  $\alpha$ -терпинена и др. В его состав входят также горький гликозид пинопикрин, галловая кислота (которая превращается в пирогаллол), дубильные вещества, смола, воск, витамин С, органические кислоты, кумарины, флавоноиды (до 2,13 %), лигнаны [Мырзагалиева и др., 2014]

**Лабораторное тестирование растительного экстракта и эфирного масла на наличие инсектицидных, антифидантных и репеллентных свойств по отношению к гусеницам галлерии.** Тестирование растительного экстракта проводили в лабораторных условиях на гусеницах 3–4 возраста галлерии – большой вошинной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Гусеницы галлерии

выбраны в качестве тест-объектов из-за относительно доступного и недорогого способа разведения в лабораторных условиях, а также ввиду слабого каннибализма между ними. Гусениц содержали в термостате с регулируемыми условиями при заданной температуре  $+26 \pm 2$  °С и влажности воздуха 70 % [Коновалова, 2009; Осокина, 2016]. В качестве корма для гусениц вошинной моли использовали старые пчелиные соты (смесь светлых и темных сот с примесью перги и меда до 15 %, восковитость 55–70 %), которые предварительно мелко измельчали и тщательно перемешивали.

В первом и втором вариантах корм обрабатывали методом нанесения микропипеткой по 200 мкл эфирного масла и экстракта растения *J. sabina* в каждой повторности (всего по пять повторностей в варианте) и тщательно перемешивали, выдерживали на открытом воздухе в течение часа, затем раскладывали по чашкам Петри, в которые подсаживали насекомых. Контролем служил вариант без обработки корма. В четвертом и пятом вариантах насекомым наносили на дорзальную область с помощью микропипетки по 0,2 мкл эфирного масла и экстракта, в контроле насекомым наносили на дорзальную область дистиллированную воду. В первом и втором вариантах насекомым предлагали корм на выбор – необработанный и обработанный по 1,5 г, который размещали на разных концах чашек Петри (диаметр чашек 14 см). В контроле, четвертом и пятом вариантах содержался необработанный корм. Из литературных данных известно, что в среднем одной гусенице галлерии для завершения полного развития от отрождения из яиц до окукливания необходимо 0,4 г корма, в опыте в каждом варианте размещали по 3 г корма на пять гусениц, что полностью удовлетворяло условиям.

Репеллентную активность экстракта и эфирного масла из растения *J. sabina* в лабораторных условиях определяли на протяжении 18 дней. Каждый вариант состоял из пяти повторностей по пять гусениц в каждой. Учитывалось движение гусениц от центра чашки в месте посадки к корму – обработанному и необработанному. Далее, учитывалось распределение гусениц между обоими видами корма.

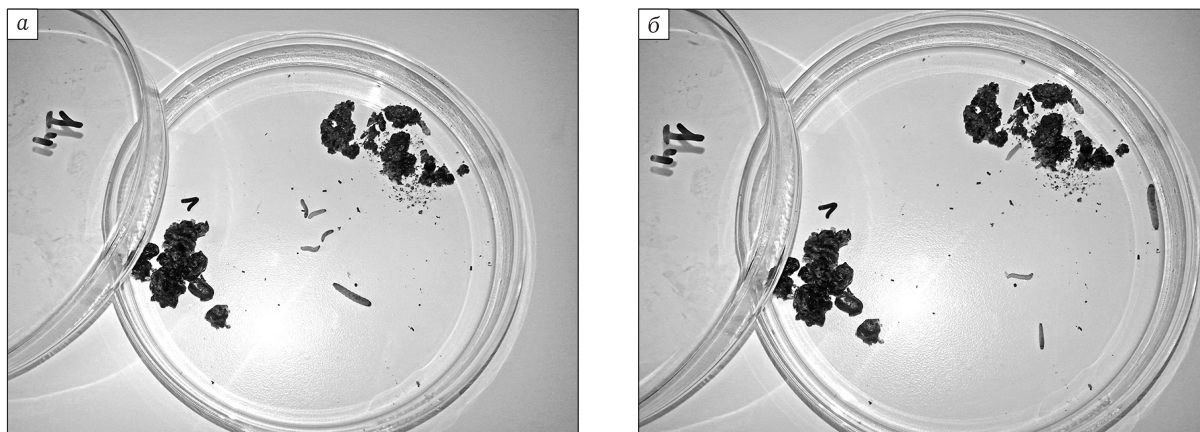


Рис. 1. Движение гусениц от центра в сторону необработанного корма при выборе среды (вариант обработки корма эфирным маслом *Juniperus sabina*).

а – момент посадки гусениц в центр чашки Петри; б – движение гусениц в сторону необработанного корма в течение 1–2 мин после посадки

Антифидантную активность экстракта и эфирного масла из растения *J. sabina* в лабораторных условиях определяли на протяжении 18 дней с момента закладки опыта. Учитывали количество съеденной пищи – обработанной и необработанной и сравнивали с контролем. Рассчитывали количество съеденной пищи одной гусеницей в течение суток и за весь учетный период. Далее показатели сравнивали с контролем.

Инсектицидную активность (эффективность) определяли по количеству погибших насекомых за трое суток в сравнении с контролем по формуле

$$I = 100 \times \left( 1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a} \right), \quad (3)$$

где  $I$  – инсектицидная эффективность снижения численности насекомых, %;  $T_a$  – средняя численность живых насекомых в опыте;  $T_b$  – количество опытных насекомых;  $C_a$  – средняя численность живых насекомых в контроле;  $C_b$  – количество контрольных насекомых.

В случае если  $C_a = 0$ , то расчеты проводили по формуле

$$I = 100 \times \left( 1 - \frac{T_a}{T_b} \right). \quad (4)$$

**Действие на фазы куколки и имаго (детеррентная активность).** Оценивали влияние спиртового экстракта и эфирного масла из растения *J. sabina* при кормлении гусениц обработанным кормом, а также при топи-

кальном дорзальном нанесении. Наблюдения за насекомыми проводили периодически в течение месяца. Отмечали начало окукливания, отрождение имаго и его вес.

Математическую обработку полученных данных проводили согласно методу однофакторного дисперсионного анализа и расчету стандартного отклонения с использованием компьютерных методов обработки данных в пакете программ Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований установлено, что эфирное масло и экстракт из растения *Juniperus sabina* обладают репеллентными свойствами. Так, при посадке в центр чашки Петри с двумя навесками корма – обработанной и необработанной – отмечено, что гусеницы галлерии *Galleria mellonella* движутся по направлению к необработанному корму и там начинают зарываться в корм и приступают к питанию (рис. 1).

Для достоверности полученных результатов гусениц несколько раз собирали из корма в центр и снова наблюдали траекторию и скорость их движения по направлению к необработанному корму. Таким образом, спиртовой экстракт и эфирное масло из растения *J. sabina* однозначно обладают репеллентным эффектом по отношению к гусеницам *G. mellonella*. В то же время установлено, что скорость движения у гусениц в противопо-

Т а б л и ц а 1

**Влияние эфирного масла и спиртового экстракта из *Juniperus sabina* на пищевое предпочтение гусениц *Galleria mellonella* в лабораторных условиях**

Вариант	Доля питающихся гусениц <i>Galleria mellonella</i> , %			
	Через сутки		Через 4 сут	
	О	Н	О	Н
Контроль	0	100	0	100
Обработка эфирным маслом <i>J. sabina</i>	0	100	0	100
Обработка 96%-м этанольным экстрактом <i>J. sabina</i>	46	54	40	60

П р и м е ч а н и е. О – обработанный корм, Н – необработанный корм.

ложную от обработанного корма сторону в варианте с эфирным маслом выше, чем в варианте со спиртовым экстрактом.

Дальнейшие наблюдения за поведением гусениц показали, что в первом варианте (обработка корма эфирным маслом можжевельника) при наличии выбора гусеницы питаются только необработанным кормом в течение двух недель. И только спустя две недели единичные особи приступают к питанию обработанным кормом. Во втором варианте (обработка корма спиртовым экстрактом из *J. sabina*) при наличии выбора уже на следующие сутки отмечено питание гусениц и обработанным кормом: доля гусениц в обработанном корме даже незначительно превышала таковую в необработанном (табл. 1).

Таким образом, спиртовой экстракт обладает слабо выраженными репеллентными свойствами, в то время как эфирное масло проявляет устойчивый отпугивающий эффект в течение двух недель.

Для определения антифидантной активности экстрактов проводились контрольные взвешивания корма – до начала питания гусеницами и три взвешивания в течение всего эксперимента до момента окукливания (табл. 2).

В результате установлено, что самое низкое потребление корма из расчета на одну гусеницу оказалось в первом варианте (в 2,1 раза меньше, чем в контроле) – при обработке корма эфирным маслом из *J. sabina*. Одновременно выявлено, что вариант обработки как корма, так и насекомых спиртовым экстрактом можжевельника не снижает потребления пищи гусеницами галлерии в сравнении с контролем (см. табл. 2). Более того, в пятом варианте при топикальной обработке насекомых спиртовым экстрактом, у последних, возможно, от перенесенного стресса, даже несколько “повышается” аппетит в сравнении с контрольной группой (на 16,3 %).

Т а б л и ц а 2

**Влияние эфирного масла и спиртового экстракта из *Juniperus sabina* на питание гусениц *Galleria mellonella***

Вариант	Количество пищи, съеденной одной гусеницей в день (период 18 дней – с 07.09.2017 по 25.09.2017)			Средняя разница между вариантами и контролем	Группа
	Н	О	Всего		
I	0,0239 ± 0,0075	0,0019 ± 0,0013	0,0258 ± 0,0078	0,0287	II
II	0,0408 ± 0,0375	0,0170 ± 0,0112	0,0578 ± 0,0333	-0,0033	II
III	0,0546 ± 0,0221	*	0,0546 ± 0,0221	-	
IV	0,0336 ± 0,0209	*	0,0336 ± 0,0209	0,0210	II
V	0,0672 ± 0,0205	*	0,0672 ± 0,0205	-0,0126	II

НСР<sub>0,05</sub> = 0,0359

П р и м е ч а н и е. О – обработанный корм, Н – необработанный корм; \* – без выбора.

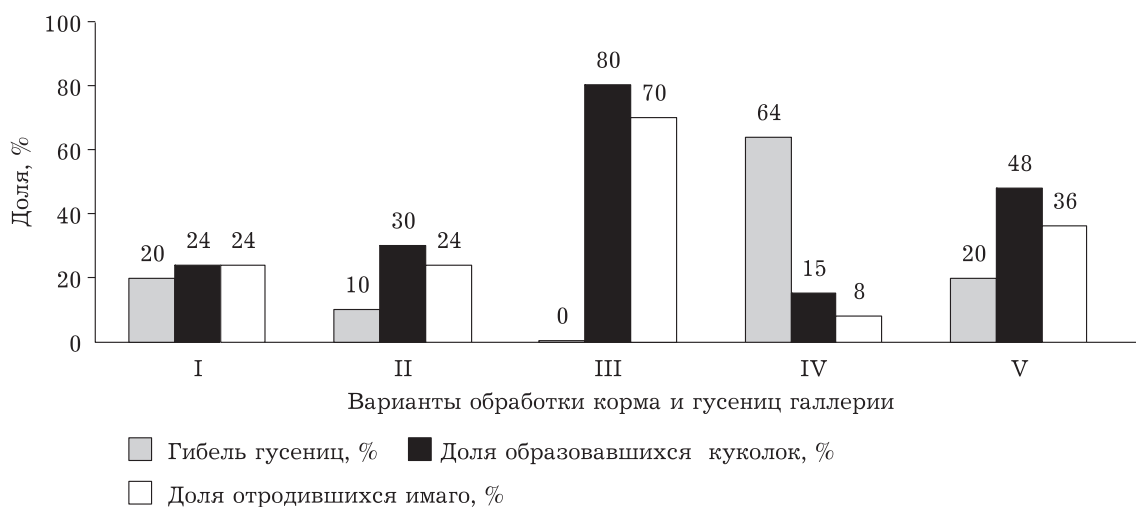


Рис. 2. Влияние эфирного масла и спиртового экстракта из *Juniperus sabina* на выживаемость гусениц, образование куколок и отрождение имаго *G. mellonella* (I – эфирное масло, обработка корма; II – спиртовой экстракт, обработка корма; III – контроль, без обработки; IV – эфирное масло, топикальное нанесение на дорзальную область насекомых; V – спиртовой экстракт, топикальное нанесение на дорзальную область насекомых)

Математический анализ данных показал, что между вариантами и контролем разница в потреблении корма незначительная ( $p = 0,166 > 0,05$ ), однако по абсолютным показателям первый и четвертый варианты незначительно снижали его потребление из расчета на одну гусеницу в сутки.

В результате изучения инсектицидного действия спиртового экстракта и эфирного масла из растения *J. sabina* на гусениц *G. mellonella* установлено, что максимальная гибель достигалась в IV варианте при топикальном нанесении эфирного масла на дорзальную область насекомых (рис. 2, 3).

Одновременно установлено, что гибель насекомых в остальных вариантах (I, II и V) колебалась в пределах 10–20 %. Математический анализ данных показал, что инсектицидная активность спиртового экстракта в варианте с обработкой корма (II) оказалась незначительно выше, чем в контроле ( $НСР_{0,05} = 15,3; p \leq 0,05$ ). Однако эффективность эфирного масла *J. sabina* и спиртового экстракта при топикальной обработке существенно превышала контроль. Между вариантами значимая разница наблюдалась только при топикальном нанесении (см. рис. 2).

Наблюдения показали, что более 2/3 гусениц после топикальной обработки эфирным маслом погибали в течение нескольких минут, их тела чернели, сморщивались и вы-

сыхали вследствие глубокого некроза тканей (рис. 4, а, б). Также отмечено, что выжившие в опыте гусеницы на протяжении 4–8 дней отставали в развитии от контрольной группы, медленнее набирали вес и позже линяли в следующий возраст. Спиртовой экстракт *J. sabina* при топикальном нанесении также приводил к гибели гусениц, однако при этом выживаемость личинок оказалась на 44 % выше, чем в варианте обработки эфирным маслом. Необходимо отметить, что в контрольной группе выживаемость гусениц достигала 100 %, и их жизненные показатели и кожные покровы оставались в норме



Рис. 3. Гибель гусениц при топикальном нанесении эфирного масла из растения *J. sabina* на дорзальную область *G. mellonella*



Рис. 4. Влияние эфирного масла из *J. sabina* на гусениц *G. mellonella* при топикальном нанесении на дорзальную область (а – вид гусеницы, погибшей в первые минуты после обработки, б – вид гусеницы, погибшей через несколько дней после начала опыта) (фото сделано с помощью Stereomicroscope SteREO Discovery.V20)

(рис. 5, а, б). Таким образом, эфирное масло из *J. sabina* обладает высоким контактным (64,0 %) и умеренным кишечным действием (20,0 %), в то время как спиртовой экстракт проявляет умеренный уровень контактной (20,0 %) и относительно невысокий уровень кишечной (10,0 %) активности.

Установлено, что немногие из гусениц галлерии, перешедшие на питание обработанным эфирным маслом кормом, также погибали, их тела при этом чернели, как и в варианте с топикальной обработкой, но наблюдались некоторые отличия – некроз тканей носил локальный характер. Если гусеницы зарывались в обработанный корм, они получали ожог покровов (рис. 6, а), при питании с краю без тесного контакта с кормом, его не наблюдалось, однако при попадании пищи в пищевод (ки-

шечный канал) ожог распространялся с пищей по всему кишечнику (рис. 6, б).

Дальнейшие наблюдения за окукливанием показали, что в контроле все гусеницы благополучно питались, линяли и окуклились. Об этом свидетельствуют такие признаки, как плетение гусеницами паутины внутри и вокруг корма (плетение паутины является показателем качественного корма) (рис. 7, а), крупные размеры гусениц и хорошее состояние кожных покровов, прохождение стадий предкуколки и куколки до имаго без гибели и отставаний от средних показателей для температурного оптимума развития +28...30 °С (рис. 8, а, б).

В среднем при температуре +28 ± 1 °С куколка галлерии развивается 7–8 дней. В контроле развитие куколок завершилось за



Рис. 5. Гусеницы *G. mellonella* в контроле (а – вид нормально питающейся здоровой гусеницы, б – гусеница в корме)



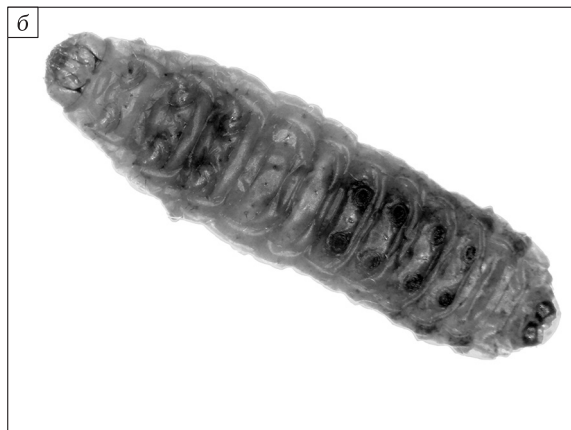


Рис. 6. Влияние эфирного масла из *J. sabina* на гусениц *G. mellonella* при обработке корма (а – гусеница, погибшая в результате контакта с обработанным кормом; б – гусеница, погибшая в результате питания кормом, обработанным эфирным маслом)



Рис. 7. Плетение паутины гусеницами *G. mellonella* старших возрастов в корме (а) и вокруг корма в контроле (б)

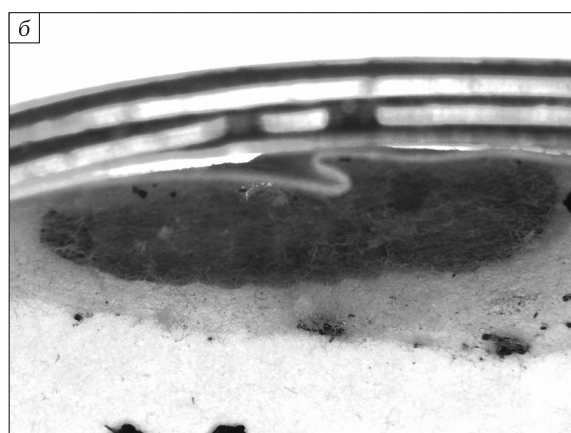
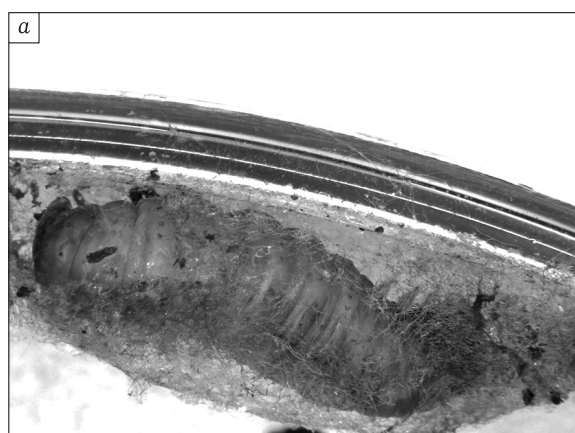


Рис. 8. Создание кокона (а) и стадия предкуколки *G. mellonella* в контроле (б)

6–8 дней (см. рис. 8, а, б). В опыте вылет бабочек оказался сильно растянут и занял от 5 до 7 дней с момента вылета первого имаго. Таким образом, в результате проведенного анализа полученных данных установлено, что и спиртовой экстракт *J. sabina*, и эфирное масло из растения обладают детеррентной активностью по отношению к *G. mellonella*. Это выражается в снижении процента образовавшихся куколок из гусениц в сравнении с контролем, а также в значительном снижении доли отродившихся имаго (см. рис. 2).

В ходе опыта определяли вес отродившихся бабочек во всех вариантах. Установлено, что наименьшая средняя масса имаго наблюдалась при применении эфирного масла (17,9 мг при обработке корма и 15,7 мг при топикальном нанесении), что существенно ниже ( $НСП_{0,05} = 10,1; p \leq 0,05$ ), чем при использовании спиртового экстракта (28,2 и 26,9 мг соответственно) и в контрольной группе (30,2 мг). Соотношение полов во всех вариантах составляло в среднем 1 : 1,2 ( $\sigma^{\circ}$  :  $\text{♀}$ ).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Вторичные метаболиты растений влияют на насекомых по-разному. Известно, что растение *J. sabina* содержит вещества терпеновой природы, полифенольные соединения и другие, обладающие выраженными антимикробными и инсектицидными свойствами [Носов, 2001; Gao et al., 2004; Nikolić et al., 2016]. Задача исследования заключалась в выяснении механизма действия этанольного экстракта и эфирного масла из *J. sabina* на различные стадии онтогенеза большой воцинной моли *Galleria mellonella*, которая является основным вредителем пчелиных ульев. Продукты пчеловодства подвергаются тщательному контролю на остаточные количества пестицидов и антибиотиков, поэтому применение малотоксичных растительных препаратов актуально, перспективно и служит предпосылкой для улучшения экологической ситуации в целом.

В ходе работы проанализированы данные авторов, изучавших влияние некоторых питательных сред на выживаемость гусениц, окукливание и формирование имаго при разведении *G. mellonella* [Mohamed et al., 2014].

Поэтому для снижения влияния негативных факторов в опытах для кормления гусениц выбиралась наиболее оптимальная питательная среда, содержащая воск хорошего качества, а также пыльцу и мед.

Существующие методы борьбы с галлерией, например, замена в пчелиных рамках натурального воска аналогами, не подходящими для питания моли, или стерилизация самцов *G. mellonella* не всегда достаточно эффективны и имеют ряд недостатков [Jafari et al., 2010; Kwadha et al., 2017]. Исследования подтвердили высокую биологическую активность можжевельника казацкого против чешуекрылых и хорошо согласуются с данными других авторов, обнаруживших инсектицидные и антифидантные свойства у выделенного из *J. sabina* деоксиподофиллотоксина против гусениц *Pieris rapae* L. [Gao et al., 2004]. Установлено, что оба – и этанольный экстракт, и эфирное масло *J. sabina* обладают инсектицидной активностью. Контактное действие препаратов существенно выше, чем кишечное – 20,0 и 64,0 % против 10,0 и 20,0 % для экстракта и масла соответственно. Одновременно выявлено, что этанольный экстракт существенно уступает эфирному маслу по силе проявления антифидантной и репеллентной активности – скорость движения гусениц от обработанного корма в варианте с эфирным маслом выше как минимум в 2 раза, чем в варианте с этанольным экстрактом. Приведенные данные свидетельствуют о продолжительности высокого антифидантного эффекта у эфирного масла в течение как минимум двух недель. Его продолжительное антифидантное действие на гусениц, скорее всего, обусловлено в первую очередь небольшим объемом воздуха в закрытом пространстве (в чашках Петри).

Исследования позволили также выявить высокую степень нарушения метаболизма у галлерии на всех стадиях онтогенеза (детеррентный эффект) под влиянием вторичных метаболитов растения *J. sabina* – доля образовавшихся куколок существенно снижалась и составляла в вариантах обработки этанольным экстрактом 30–48 %, а эфирным маслом – 15–24 % (в контроле доля образовавшихся куколок достигала 80 %). В результате определено, что применение этанольного

экстракта *J. sabina* снижало плотность популяции *G. mellonella* в целом на 64–76 %, а эфирного масла – на 76–90 %. Исходя из полученных результатов желательнее для борьбы с большой восковой молью в ульях применять эфирное масло, а не этанольный экстракт. Однако предварительно необходимо провести исследования по действию вторичных метаболитов можжевельника казачьего на пчел и их расплод. В то же время растительный экстракт и эфирное масло из *J. sabina* можно эффективно использовать для защиты ульев и рамок от большой восковой моли при их длительном хранении в складских помещениях.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования выявили наличие высокой репеллентной активности у эфирного масла из растения *Juniperus sabina*, которая в лабораторных условиях при тестировании в чашках Петри сохраняется на протяжении двух недель. Установлено, что эфирное масло обладает также инсектицидной, антифидантной и детеррентной активностью по отношению к *Galleria mellonella*, вызывая различные отклонения в онтогенезе и метаморфозе насекомых. Спиртовой экстракт из *J. sabina* обладает слабо выраженными репеллентными свойствами и не проявляет антифидантную активность в отношении гусениц *G. mellonella*. Экстракт и эфирное масло проявляют как контактное, так и кишечное действие на гусениц, однако степень токсичности эфирного масла существенно выше. Уровень контактной токсичности у экстракта и эфирного масла выше по сравнению с кишечной токсичностью. Эфирное масло вызывает локальные ожоги высокой степени наружных покровов и внутренних тканей насекомых.

Детеррентное действие спиртового экстракта и эфирного масла из растения *J. sabina* выражается в снижении процента образовавшихся куколок из гусениц *G. mellonella*, в значительном снижении доли отродившихся из куколок имаго, а также в снижении веса имаго в сравнении с контролем.

Автор выражает благодарность доценту, инженеру Я. Бриндзе и коллективу Института со-

хранения биоразнообразия и биологической безопасности Словацкого аграрного университета в Нитре за научную поддержку и предоставленную экспериментальную базу. Особая благодарность инженеру А. Оравец за помощь в подготовке фотоматериалов. Работа выполнена в рамках научной стажировки (контракт № 51700164), поддержанной Международным Вышеградским фондом (Братислава).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Артемкина Н. А., Роцин В. И. Полярные экстрактивные вещества хвои и побегов ели европейской *Picea abies* (L.) Karst // Раст. ресурсы. 2004. Т. 40, вып. 3. С. 77–86.
- Васильев С. Н., Роцин В. И., Фелеке С. Экстрактивные вещества древесной зелени *Picea abies* (L.) Karst // Там же. 1996. Вып. 1-2. С. 151–175.
- Граскова И. А., Кузнецова Е. В., Живетьев М. А., Чекуров В. М., Войников В. К. Детекция влияния обработки аналогами препарата “Силк” растений картофеля в полевых условиях // Журн. стресс-физиол. и биохим. 2009. Т. 5, № 1-2. С. 38–44 [Graskova I. A., Kuznetsova E. V., Zhivetiev M. A., Chekurov V. M., Voinikov V. K. Effect of Coniferous extract on potato plants // J. Stress Physiol. Biochem. 2009. Vol. 5, N 1-2. P. 38–44].
- Евтушенко Е. В., Сапрыкин В. А., Галицын М. Ю., Чекуров В. М. Влияние биологически активных веществ из хвойных на активность l-фенилаланин-аммонийлиазы и пероксидазы в листьях пшеницы // Прикл. биохим. и микробиол. 2008. Т. 44, № 1. С. 123–128.
- Коновалова Т. В. Лабораторное содержание и разведение большой восковой огневки *Galleria mellonella* L. // Рос. ветеринар. журн. С.-х. животные. 2009. № 4. С. 46–48.
- Маркова О. М., Карпенко В. А., Саушкина А. С., Лихота Т. Т. Использование физико-химических методов в анализе лекарственных средств растительного происхождения // Вестн. ВГУ. Сер. химия, биология, фармация. 2003. № 1. С. 99–100.
- Мырзагалиева А. Б., Медеубаева Б. З. К изучению эфирномасличности представителей семейства Cupressaceae Bartl. флоры Восточного Казахстана // Фундамент. исслед. 2014. № 5, ч. 5. С. 1021–1024.
- Носов А. М. Лекарственные растения. М., 2001. 350 с.
- Осокина А. С. Ресурсный потенциал применения большой восковой моли (*Galleria mellonella* L.) при выращивании в лабораторных условиях: дис. ... канд. биол. наук. Ижевск, 2016. 143 с.
- Хантургаев А. Г., Бадмацыренов Б. В., Ширеторова В. Г., Хантургаева Г. И. Получение кедрового масла из семян сосны сибирской экстракцией этиловым спиртом // Изв. вузов. Пищевая технология. 2003. № 1. С. 34–37.
- Хуршкайнен Т. В., Кучин А. В. Лесохимия для инноваций в сельском хозяйстве // Изв. Коми науч. центра УрО РАН. 2011. № 1. С. 17–23.
- Хуршкайнен Т. В., Скрипова Н. Н., Кучин А. В. Высокоэффективная технология комплексной переработки

- ки растительного сырья и получение препаратов для сельского хозяйства // Теорет. и прикл. экол. 2007. № 1. С. 74–77.
- Широких И. Г., Огородникова С. Ю., Широких А. А. и др. Биологическая активность терпеноидов, полученных по инновационной технологии из древесной зелени ели (*Picea obovata* L.), пихты (*Abies sibirica* L.) и березы (*Betula pendula* L.) // Агрехимия. 2008. № 10. С. 1–8.
- Elisovetskaya D., Nastas T., Bucatel V., Galupa D. Natural crop protection based on plant resources of the *Juniperus sabina* L. in the Republic of Moldova // Conservation of Plant diversity: Int. Sc. Simp. ASM, Botanical Garden, UnASM, Chisinau: S.n., 2014. P. 88–89.
- Elisovetskaya D., Nastas T., Bucatel V., Galupa D. Natural crop protection based on plant resources of the *Juniperus sabina* L. in the Republic of Moldova // J. Botany. 2015. Vol. VII, N 1 (10). P. 65–70.
- Gao R., Gao C., Tian X., Yu X., Di X., Xiao H., Zhang X. Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from *Juniperus sabina* L., and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L. // Pest Manag. Sci. 2004. Vol. 60. P. 1131–1136.
- Hesham H. A. Rassem Abdurahman H., Nour R., Yunus M. Techniques for extraction of essential oils from plants: A review // Australian Journ. Basic and Appl. Sci. 2016. Vol. 10 (16). P. 117–127. ISSN: 1991-8178, EISSN: 2309-8414.
- Jafari R., Goldasteh S., Afrogheh S. Control of the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) by the male sterile technique (MST) // Arch. Biol. Sci. 2010. Vol. 62 (2). P. 309–313. DOI:10.2298/ABS1002309J 309.
- Kwadha C. A., Ong'amo G. O., Ndegwa P. N., Raina S. K., Fombong A. T. The biology and control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* // Insects. 2017. Vol. 8 (2). P. 61–100. Published online 2017 Jun 9. doi: 10.3390/insects8020061.
- Mohamed A. A., Ansari M. J., AL-Ghamdi AHM AD., Mohamed M. O., Kaur M. T. Effect of larval nutrition on the development and mortality of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) // Revista Colombiana de Entomologia. 2014. Vol. 40 (1). P. 49–54.
- Nikolić B. et al. Screening of the antibacterial effect of *Juniperus sibirica* and *Juniperus sabina* essential oils in a microtitre platebased MIC assay // Bot. Serbica. 2016. Vol. 40 (1)/ P. 43–48.

## **Effect of Secondary Metabolites *Juniperus sabina* L. (Cupressaceae) on the Survival and Nutrition *Galleria mellonella* L. (Pyralidae)**

D. S. ELISOVETSKAYA<sup>1</sup>, J. BRINDZA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection ASM, Chisinau MD-2002, Chisinau, 20, Padurii, Republic of Moldova  
E-mail: dina.elis.s@gmail.com*

<sup>2</sup> *Slovak University of Agriculture in Nitra  
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra  
E-mail: brindza.jan@gmail.com*

The effect of alcohol extract and essential oil from *Juniperus sabina* L. (Cupressaceae) on the survival and nutrition of the larvae *Galleria mellonella* L. (Pyralidae) was studied. It was found that the essential oil has insecticidal, antifeedant, deterrent and repellent properties. The loss of larvae with topical application of 0.2 ml of essential oil to the dorsal part (contact action) reaches 64.0 %. Feeding larvae with food treated with essential oil of *J. sabina* (200 ml of essential oil per 1.5 grams of feed) is reduced by 2.1 times compared to the control. It is shown that larvae *G. mellonella* avoid feeding on the oil treated feed during 14 days, and actively move in the opposite direction from the treated feed when they are placed in Petri dishes. It has been established that vapors of essential oil suppress the development of larvae *G. mellonella* even when fed with untreated food – there is a lag in body weight and a delay molting in the next age. The essential oil of *J. sabina* also exhibits moderate toxicity (20.0 %) when the larvae eat the treated food, i. e. possess intestinal action. The alcohol extract of *J. sabina* at a concentration of 2.5 % of active substances (on dry residue) has a negligible (insignificant) effect on the loss of larvae in the case with treatment of feed (10.0 % contact action). With topical application to the dorsal part, the extract causes 20.0 % of insect death. Antifeedant and repellent properties against larvae alcohol extract of *J. sabina* did not show, however, a low level of deterrent activity, expressed in suppressing the formation and development of pupae of *Galleria mellonella*, was noted. Essential oil reduced the percentage of pupated larvae.

**Key words:** extract, essential oil, *Juniperus sabina*, repellent, antifeedant, insecticide, deterrent.