

УДК 582.288 : 575.21

В. Ю. Крюков,<sup>1</sup> О. Н. Ярославцева,<sup>1</sup> М. В. Левченко,<sup>2</sup>  
Г. Р. Леднев,<sup>2</sup> В. В. Глузов<sup>1</sup>

### ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA*

KRYUKOV V. Yu., YAROSLAVTSEVA O. N., LEVCHEENKO M. V.,  
LEDNEV G. R., GLUPOV V. V. PHENOTYPICAL VARIABILITY IN NATURA  
ISOLATES OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *BEAUVERIA BASSIANA*

Гриб *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. является патогеном для широкого круга насекомых из разных отрядов. Штаммы этого вида значительно различаются по морфологическим, физиологическим и вирулентным свойствам. В данном случае под вирулентностью авторы понимают количественную меру патогенности (Вайзер, 1972). Известно, что географическая изоляция является основным фактором внутривидовой дифференциации *B. bassiana* (Rehner, Buckley, 2005). При этом внутрипопуляционная изменчивость гриба исследована недостаточно. Неоднократно специалисты пытались установить взаимосвязи между морфологией колоний *B. bassiana*, интенсивностью спороношения и вирулентностью (Евлахова, 1966; Алешина и др., 1972; Огарков, Огаркова, 2000; Гештовт, 2002; Крюков и др., 2007). Однако однозначного ответа на данный вопрос до сих пор найти не удалось. При этом было установлено, что наиболее вирулентными и перспективными для массового культивирования являются штаммы гриба с мучнистой гладкой структурой колоний, а культуры с войлочной и ватообразной структурой оказываются менее вирулентными и слабо спороносящими. В ряде работ показана связь между вирулентностью штаммов *B. bassiana* и активностью протеолитических, липолитических и хитиноподобных ферментов (Павлюшин, 1979; Гештовт, 2002). Другие специалисты (Борисов и др., 2001) такой корреляции не обнаружили. Остается открытым вопрос о приуроченности штаммов *B. bassiana* к определенной группе хозяев. Неизвестно, зависит ли вирулентность штамма гриба от таксономической принадлежности хозяина, из которого он был выделен. Некоторые авторы предполагают, что в результате адаптации к местным популяциям насекомых в биоценозе могут формироваться расы гриба, отличающиеся высокой специфичностью по отношению к тем или иным хозяевам (Андросов и др., 1981; Крюков и др., 2007). Однако приуроченность к насекомым определенных групп у рода *Beauveria* прослеживается только на уровне видов, при этом весьма нечетливо (Rehner, Buckley, 2005). В то же время у других широко специализированных гифомицетов, например, у *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, установлена внутривидовая специализация к насекомым разных отрядов (Humber, 1997) или видов (Fargues, Robert, 1983). Следует отметить, что изучение полиморфизма и трофических

<sup>1</sup> Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск.

<sup>2</sup> ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург.

преференций *B. bassiana* весьма актуально также с позиций практической экологии, в особенности для разработки программ по созданию искусственных эпизоотий в популяциях насекомых.

Цель данной работы — изучение морфофизиологических и вирулентных свойств изолятов *B. bassiana* одной географической популяции (Новосибирская обл.), выделенных из насекомых различных групп.

### Материал и методы

Основная часть изолятов *B. bassiana* (33 культуры) была выделена из различных насекомых в восточной части Новосибирской обл. (54°35'—55°05' с. ш., 82°45'—84°00' в. д.) в июле—сентябре 2006 г. Также в работе использованы два штамма (Сар-31, ББК-1), выделенные на юге Новосибирской обл. в окрестностях г. Карасук (53°03' с. ш., 78°03' в. д.) в 2000—2001 гг. Насекомые-хозяева гриба принадлежали к следующим таксонам: Heteroptera — Miridae sp. (2), Pentatomidae sp. (2); Orthoptera — Calliptamus italicus L. (2); Homoptera: Cicadidae sp. (1); Coleoptera — Brachysomus echinatus Bonsd. (9), Polydrusus undatus F. (1), Eudipnus mollis Strom (1), Staphylinidae sp. (2), Cisitidae sp. (1), Chrysomelyidae sp. (1), Carabidae sp. (1), Elateridae sp. (1); Lepidoptera — Thyatiridae sp. (1), Macroheterocera sp. (3); Hymenoptera — Cimbex sp. (1), Formicoidea sp. (2); Diptera — Asellidae sp. (1), Cyclorhapha sp. (1); Insecta sp. (2). Выделение и поддержание культур в лабораторных условиях проводили по общепринятым методикам (Бойкова, Новикова, 2001).

При определении биомассы воздушного мицелия и количества спор изолятов использовали газонный посев на агаризованную среду Ваксмана (Литвинов, 1969) в чашки Петри диаметром 90 мм (64 см<sup>2</sup>). Через 45 суток культивирования при 25 °С воздушный мицелий и споры грибов соскабливали со среды шпателем, просушивали в течение 10 суток при той же температуре, взвешивали и размельчали в ступке. Подсчет конидий проводили в камере Горяева.

Для оценки скорости роста грибов использовали точечный посев на среды Ваксмана и Сабуро с последующим измерением диаметра колоний с интервалом в 2 суток в течение одного месяца. Рельефность колоний оценивали на 30-е сутки визуально по 3-бальной системе: 1 — нерельефные, 2 — слаборельефные, 3 — сильно-рельефные.

Протеолитическую и липолитическую активность изолятов определяли экспресс-методом на агаризованных средах с добавлением обезжиренного сухого молока (2 %) или Твина-80 (Павлюшин, 1979). На данные среды помещали агаровые блоки диаметром 7 мм с 3-суточным мицелием грибов. Показателем ферментативной активности служила ширина зон протеолиза на 3-и сутки и зон липолиза на 6-е сутки инкубирования при 25 °С.

Вирулентность изолятов оценивали на личинках II и III возраста колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say), на нимфах II и III возраста пустынного пруса (*Calliptamus barbarus* Costa), азиатской саранчи (*Locusta migratoria* L.) и в ряде опытов на гусеницах III возраста крапивницы (*Aglais urticae* L.). Чтобы осуществить заражение, насекомых однократно окунали в водные суспензии конидий гриба. Личинок помещали в пластиковые контейнеры объемом 700 мл и накрытые сверху сеткой. Все эксперименты проводили как минимум в 3 повторностях, по 10—15 особей в каждой. Смену корма и учет погибших насекомых проводили ежедневно в течение 10—17 суток в зависимости от уровня их смертности.

Для сравнительного анализа вирулентности изолятов использовали показатели смертности нимф саранчовых и гусениц крапивницы на 8—10-е сутки после инфицирования, а колорадского жука — на 12—15-е сутки после инфицирования. Уровень смертности, зарегистрированный в указанные сроки, характеризовался максимальной дисперсией, что позволило наиболее точно провести дифференциацию изолятов по признаку вирулентности.

## Результаты и обсуждение

При культивировании изолятов на средах Ваксмана и Сабуро было выявлено пять типов колоний (рис. 1). У штаммов первого типа колонии мучнистые нерельефные (а), у изолятов второго типа — войлочные нерельефные (б), у третьего типа — войлочно-мучнистые рельефные (в), у четвертого — войлочные рельефные (г) и у пятого — вагообразные (д). Наиболее часто встречались морфоварианты г (18 изолятов) и б (8 изолятов), реже — а, в и д (по 3 изолята). Установлено, что наибольшие биомасса и титр конидий характерны для культур с мучнистой структурой колоний (рис. 2). Самые низкие показатели биомассы и титра отмечены у морфовариантов б и г. Следует отметить, что для морфотипа а характерно также наиболее быстрое формирование спороношения — на 9—13-е сутки. У других морфовариантов основная масса спор образуется на 20—35-е сутки.

В экспериментах на личинках колорадского жука установлено, что низко-, средне- и высоковирулентные изоляты могут относиться к любым морфовариантам, при этом доля высоковирулентных культур выше среди изолятов с более рельефной структурой колоний (рис. 3). Аналогичная тенденция наблюдалась в экспериментах на пустынном прусе.

Выяснено, что все изучаемые изоляты проявляли протеолитическую и липолитическую активность. Ширина зон протеолиза варьировала от 1 до 8 мм, а ширина зон липолиза — от 16 до 26 мм. На данной группе изолятов *B. bassiana* не выявлено достоверной корреляции между вирулентностью и активностью протеаз ( $r < 0.27$ ,  $p > 0.05$ ). Также не обнаружено взаимосвязи между вирулентностью и скоростью радиального роста колоний на разных средах ( $r < 0.14$ ,  $p > 0.05$ ). Установлены слабые положительные корреляции на уровне 0.38—0.45 ( $p < 0.05$ ) между липазной активностью и вирулентностью изолятов по отношению к саранчовым и колорадскому жуку, а также достоверные ( $p < 0.05$ ) корреляции на уровне 0.35—0.48 между продуктивностью конидий, рельефностью колоний и вирулентностью для тест-насекомых.

При сравнительной оценке вирулентности культур по отношению к разным насекомым на первом этапе работы было изучено два изолята *B. bassiana* — Саp-31 и ББК-1. Данные культуры многократно тестировали на насекомых в течение 4 лет в 2005—2008 гг. Следует отметить, что изучаемые изоляты весьма стабильны по морфокультуральным и вирулентным свойствам, выделены из одного вида насекомого (*Calliptamus italicus* L.) в одном и том же географическом пункте (окрестности

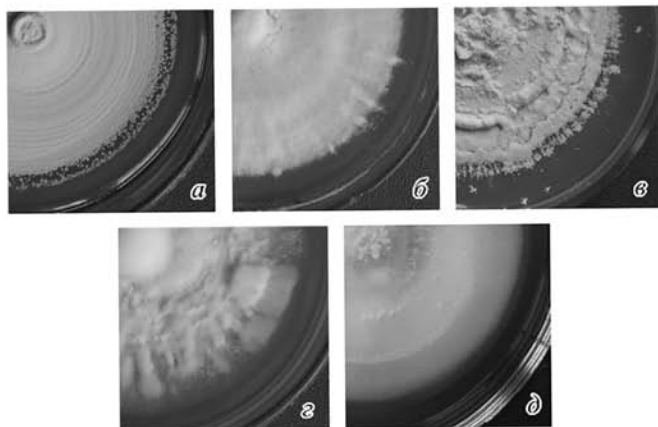


Рис. 1. Морфоварианты *Beauveria bassiana* на агаризованной среде Ваксмана.

а — мучнистые нерельефные, б — войлочные нерельефные, в — войлочно-мучнистые рельефные, г — войлочные рельефные, д — вагообразные.

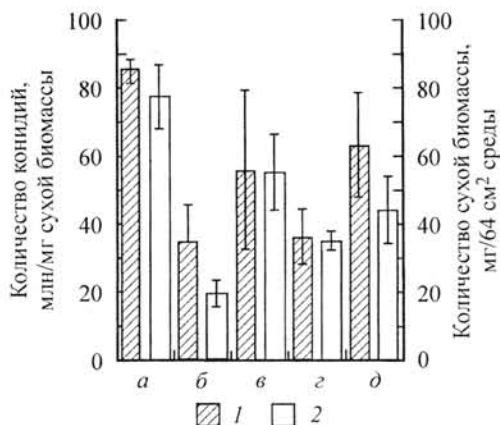


Рис. 2. Интенсивность спороношения и выход биомассы у изолятов *B. bassiana*, относящихся к разным морфовариантам, на среде Ваксмана.

1 — количество конидий, 2 — биомасса. Интервалы — ошибка средней арифметической.

г. Карасук) и имеют одинаковый тип колоний (а). Установлено что изолят с высокой вирулентностью по отношению к представителям одного отряда насекомых оказался в то же время высокоактивным и для других отрядов насекомых. Так, ББК-1 вызывал более высокую смертность азиатской саранчи, колорадского жука и крапивницы по сравнению с культурой Сар-31 (рис. 4). Следует также отметить, что аналогичные результаты были получены нами ранее при исследовании вирулентности двух штаммов другого энтомопатогенного гриба — *Metarhizium anisopliae* на этих же насекомых (Крюков и др., 2008).

На втором этапе исследовали 35 природных изолятов *B. bassiana*. Установлена тесная достоверная связь между вирулентностью данных культур для пустынного пруса и колорадского жука (рис. 5). Такой же эксперимент с использованием 26 изолятов повторили на личинках колорадского жука и азиатской саранчи. Как и в первом случае, корреляция оказалась высокой и достоверной ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.00001$ ). Полученные факты свидетельствуют о возможном отсутствии специализации данных изолятов по отношению к насекомым указанных отрядов. Отличия по вирулентности между группами изолятов, выделенных из насекомых разных отрядов, оказались

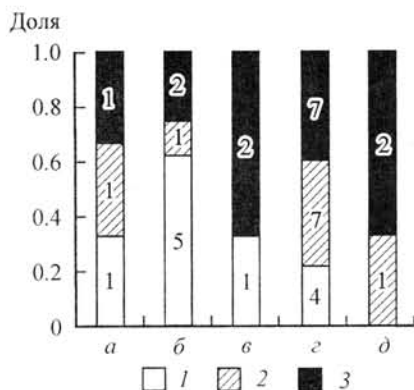


Рис. 3. Соотношение изолятов с разным уровнем вирулентности для колорадского жука среди морфовариантов *B. bassiana* (15-е сутки после инокуляции, титр  $5 \times 10^6$  конидий/мл).

1 — низковирулентные (смертность 10–40 %), 2 — средиевирулентные (40–70 %), 3 — высоковирулентные (70–100 %). Цифры на столбцах — число изолятов.

**Вирулентность изолятов *Beauveria bassiana*, выделенных из различных отрядов насекомых, по отношению к личинкам колорадского жука и пустынного пруса**

Отряд насекомого-хозяина	Число изолятов	Смертность колорадского жука из отряда Coleoptera, %	Смертность пустынного пруса из отряда Orthoptera, %
Homoptera	1	93	100
Heteroptera	4	38 ± 9	74 ± 14
Orthoptera	2	44 ± 17	65 ± 20
Coleoptera	17	55 ± 6	71 ± 6
Lepidoptera	4	68 ± 14	84 ± 12
Hymenoptera	3	34 ± 8	57 ± 14
Diptera	2	25 ± 3	48 ± 15

Примечание. Концентрация инокулюма при заражении колорадского жука составляла  $5 \times 10^6$  конидий/мл, смертность на 15-е сутки опыта, для пруса —  $1 \times 10^6$  конидий/мл, смертность на 8-е сутки. После знака «±» указана ошибка средней арифметической.

недостовверными. Отмечены высокие показатели вариабельности в смертности насекомых (см. таблицу). Наиболее вирулентным для колорадского жука и пустынного пруса оказался штамм, изолированный из цикады. Относительно высокая вирулентность для обоих видов отмечена у культур, выделенных из чешуекрылых и жуков, а для пустынного пруса также у штаммов, выделенных из клопов. Меньшая вирулентность у культур — из прямокрылых, двукрылых, перепончатокрылых. Установлено, что штаммы, выделенные из одного вида насекомого в конкретном месте, могут сильно отличаться по вирулентности. Так, 8 изолятов *B. bassiana*, выделенных из жука-долгоносика *B. echinatus* на локальном участке (100 м<sup>2</sup>), проявили самую различную активность по отношению к колорадскому жуку (смертность от 10 до 83 %) и пустынному прусу (от 40 до 100 % смертности).

Таким образом, в популяциях *B. bassiana* существует несколько морфотипов, при этом внутри каждого имеются штаммы с различным уровнем вирулентности. Большая доля вирулентных изолятов отмечена среди морфовариантов с рельефными и ватообразными колониями. Эти результаты несколько отличаются от ранее полученных данных по полиморфизму *B. bassiana* (Огарков, Огаркова, 2000; Крюков и др., 2007)

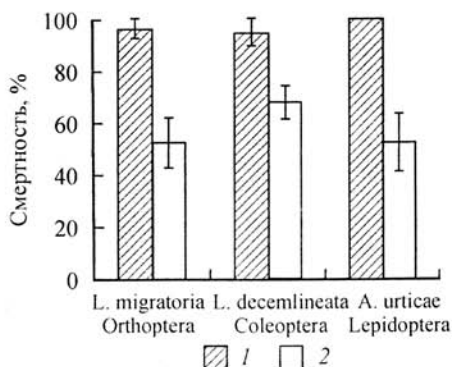


Рис. 4. Вирулентность двух изолятов *B. bassiana* по отношению к насекомым различных отрядов (10-е сутки опыта для перелетной саранчи и гусениц крапивницы, 12-е сутки опыта для колорадского жука, титр  $1 \times 10^7$  конидий/мл).

1 — ББК-1, 2 — Cap-31.

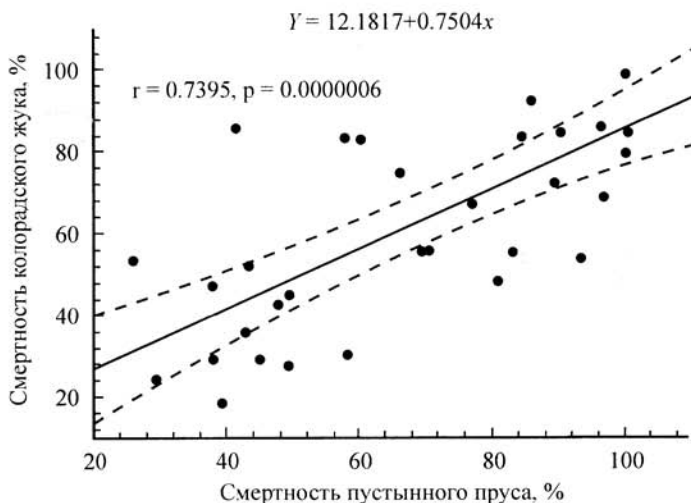


Рис. 5. Вирулентность изолятов *B. bassiana* по отношению к личинкам колорадского жука (15-е сутки опыта, титр  $5 \times 10^6$  конидий/мл) и пустынного пруса (8-е сутки опыта, титр  $1 \times 10^6$  конидий/мл).

и согласуются с результатами по спонтанной изменчивости *M. anisopliae* (Serebrov et al., 2007). С практической точки зрения наиболее перспективным является отбор штаммов с мучнистыми нерельефными колониями, поскольку у данных культур отмечают наибольшую биомассу и высокий титр конидий. Низкий уровень корреляций между различными морфофизиологическими признаками изолятов и их вирулентностью подтверждает тот факт, что вирулентность — комплексный признак, обусловленный многими свойствами энтомопатогенных микромицетов (Вайзер, 1972; Митина и др., 1997; Борисов и др., 2001).

Культуры *B. bassiana*, выделенные на небольшой территории или даже в определенном пункте из одного вида насекомого, очень вариабельны по вирулентности. Установлено, что изолят, обладающий высокой активностью по отношению к насекомым определенного отряда, со значительной долей вероятности оказывается высоковирулентным к насекомым других отрядов. Трофической специализации у исследуемой группы изолятов не выявлено. Полученные результаты согласуются с данными других авторов. В частности, по мнению специалистов (Огарков, Огаркова, 2000), вирулентность изолятов *B. bassiana* по отношению к тепличной белокрылке *Trialeurodes vaporariorum* Wstw. не зависит от источников выделения. При исследовании генетического полиморфизма *B. bassiana* было показано, что основную роль во внутривидовой дифференциации играют территориальные факторы, а не хозяева патогена (Rehner, Buckley, 2005). Используемый нами подход не позволяет полностью отрицать существование специализации к тем или иным хозяевам внутри популяций гриба. Во-первых, возможно, что уровень смертности насекомых не является критерием специфичности изолятов *B. bassiana* к разным насекомым. Ранее было показано, что не на всех хозяевах разные штаммы гифомицетов могут успешно завершать жизненный цикл и давать интенсивный конидиогенез (Крюков и др., 2008). Во-вторых, известно, что «физиологический» круг хозяев патогена, определяемый в лабораторных экспериментах, и его «экологический» круг хозяев в природе могут не совпадать, поскольку это связано со средой обитания, поведением, особенностями жизненного цикла хозяев и другими факторами, действующими в естественных условиях (Jaronski et al., 2003). Кроме того, мы не имеем представления, среди каких групп насекомых циркулировал определенный штамм до того, как он был выделен из конечного погибшего насекомого. Для исследования вопроса о возможности формирования рас, специфичных к определенной группе насекомых-хозяев у такого широкоспециализированного вида, как *B. bassiana*, необходимо исследование изменений морфо-



физиологических и вирулентных свойств штаммов в серии пассажей через разных хозяев.

Авторы признательны коллективу Лаборатории биотехнологии Казахского института защиты и карантина растений (г. Алма-Ата) за помощь в организации экспериментов, а также А. А. Легалову (Институт систематики и экологии животных СО РАН) за идентификацию жуков Curculionidae.

Работа выполнена при частичной поддержке фондов Интеграция СО РАН (грант № 46), Президента РФ (грант МК-1431.2009.4) и РФФИ (грант № 09-04-00380).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андросов Г. К., Андросова Л. Н., Соболева Л. А. Экология энтомопатогенных микроорганизмов ташной зоны Европейского Северо-Востока // Использование микроорганизмов для борьбы с вредными насекомыми в сельском и лесном хозяйстве. Иркутск, 1981. С. 139—150.

Алешина О. А., Ильичева С. Н., Кононова Э. В., Коляда Н. А. Основные критерии для отбора штаммов гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. для производственных целей // Микология и фитопатология. 1972. Т. 6, вып. 4. С. 341—344.

Бойкова И. В., Новикова И. И. Выделение энтомопатогенных дейтеромицетов / Под ред. В. В. Глупова // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год, 2001. С. 698—708.

Борисов Б. А., Серебров В. В., Новикова И. И., Бойкова И. В. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты / Под ред. В. В. Глупова // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год, 2001. С. 352—427.

Вайзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. М.: Колос, 1972. 640 с.

Гештовт Н. Ю. Энтомопатогенные грибы (биотехнологические аспекты). Алма-Ата: НИИЗР, 2002. 288 с.

Евлахова А. А. Спонтанная и индуцированная изменчивость грибов рода *Beauveria* // Тез. докл. Междунар. конгр. по микробиологии. 1966. С. 315.

Крюков В. Ю., Леднев Г. Р., Дубовский И. М., Серебров В. В., Левченко М. В., Ходырев В. П., Сагитов А. О., Глупов В. В. Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (*Deuteromyces*, *Hyphomycetes*) для регуляции численности насекомых // Евразийский энтомол. журн. 2007. Т. 6, № 2. С. 195—204.

Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Левченко М. В., Леднев Г. Р. Вирулентность штаммов *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisopliae* по отношению к насекомым различных отрядов // Матер. V Всерос. съезда паразитологического общества при Российской академии наук «Паразитология в XXI веке — проблемы, методы, решения». 2008. Т. 2. С. 97—98.

Литвинов М. А. Методы изучения микроскопических грибов. Л.: Наука, 1969. 124 с.

Митина Г. В., Сергеев Г. Е., Павлюшин В. А. Влияние химических и морфолого-культуральных особенностей природных изолятов *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas на вирулентность в отношении личинок оранжерейной белокрылки // Микология и фитопатология. 1997. Т. 31, вып. 1. С. 57—64.

Огарков Б. Н., Огаркова Г. Р. Энтомопатогенные грибы Восточной Сибири. Иркутск: Изд-во Иркутск. ун-та, 2000. 134 с.

Павлюшин В. А. Факторы вирулентности гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. и патогенез мускардиноза насекомых: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. Л., 1979. 24 с.

Fargues J. F., Robert P. H. Effects of passaging through scarabid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae* // Can. J. Microbiol. 1983. Vol. 29, N 5. P. 576—583.

Humber R. A. Fungi: Identification / Ed. L. A. Lacey // Manual of techniques in insect pathology. Acad. Press, 1997. P. 153—185.

Jaronski S. T., Goettel M. S., Lomer C. J. Regulatory requirements for ecotoxicological assessments of microbial insecticides — how relevant are they? / Eds H. M. T. Hokkanen, A. E. Hajek // *Environmental Impacts of Microbial Insecticides*. The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 2003. P. 237—260.

Rehner S. A., Buckley E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs // *Mycologia*. 2005. Vol. 97. N 1. P. 84—98.

Serebriv V. V., Maljarchuk A. A., Shternshis M. V. Spontaneous variability of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. strains as an approach for enhancement of insecticidal activity // *Plant Sci.* (Sofia). 2007. Vol. 44. N 3. P. 236—239.

Институт систематики и экологии животных СО РАН

Новосибирск  
ВНИИ защиты растений  
Санкт-Петербург  
krukoff@mail.ru

Поступила 19 V 2009

### Р Е З Ю М Е

Изучены 35 изолятов *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., выделенных из различных насекомых в Новосибирской обл. Установлено, что среди разных морфовариантов гриба встречаются низко-, средне- и высоковирулентные культуры. Между вирулентностью изолятов и их морфологическими признаками (липазная и протеазная активность, биомасса, скорость радиального роста, продуктивность конидий, рельефность) отмечены низкие коэффициенты корреляции ( $r < 0.48$ ). Выяснено, что изоляты, обладающие высокой вирулентностью для насекомых определенного отряда, оказываются также высокоактивными для насекомых других отрядов. Показана тесная взаимосвязь ( $r > 0.74$ ) между вирулентностью культур для колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) и саранчовых (*Calliptamus barbarus* Costa, *Locusta migratoria* L.). При этом установлено, что изоляты, выделенные из одного вида насекомого в одном пункте, могут сильно отличаться по вирулентности.

Ключевые слова: *Beauveria bassiana*, морфовариант, вирулентность, изолят, колорадский жук, *Leptinotarsa decemlineata*, саранчовые, *Calliptamus barbarus*, *Locusta migratoria*.

### S U M M A R Y

Thirty-five *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. isolates from different insects in Novosibirsk region were investigated. It was found out that low-, medium- and high- virulent isolates are present at various fungus morphotypes. The low correlation between virulence and morphophysiological features (lipolytic and proteolytic activity, biomass, radial growth rate, conidia productivity, relief) was noted ( $r < 0.48$ ). The isolates characterized by high virulence to the insects of certain order were virulent to the other insect orders at the same level. The close correlation ( $r > 0.74$ ) between isolates virulence against the potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) and locusts (*Calliptamus barbarus* Costa, *Locusta migratoria* L.) was shown. It was found that isolates obtained from insects of the same species in the same place may be very different in virulence.

Key words: *Beauveria bassiana*, morphotypes, virulence, isolate, potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, locusts, *Calliptamus barbarus*, *Locusta migratoria*.