

УДК 57.083.13 : 582.282

© В. Ю. Крюков, О. Н. Ярославцева, А. Е. Кухаренко, В. В. Глунов

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СТРОМ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА
CORDYCEPS MILITARIS (HYPOCREALES)
НА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ХОЗЯЕВАХ**

KRYUKOV V. Yu., YAROSLAVTSEVA O. N., KUKHARENKO A. E., GLUPOV V. V.
STROMATA CULTIVATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS
CORDYCEPS MILITARIS (HYPOCREALES) ON NONSPECIFIC HOSTS

*Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск
krukoff@mail.ru
Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул*

Исследованы особенности образования мицелия и плодовых тел *Cordyceps militaris* при перкутанном и интрагемоцеллюлярном инфицировании насекомых разными типами спор гриба. Методом инъекции в гемоцель насекомых гифальных тел *C. militaris*, выращенных в глубоинной культуре, получены стромы гриба на неспецифических хозяевах: *Gryllus bimaculatus* Deg. (Orthoptera), *Pachnoda marginata* Drury (Coleoptera), *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera). При перкутанном заражении конидиями гусениц разных видов чешуекрылых (*G. mellonella*, *Malacosoma parallela* Staud., *Operophtera* sp.) на погибших насекомых формировалось только анаморфное спороношение, при этом доля трупов, обрастающих мицелием, была невысокой (<15 %).

Ключевые слова: энтомопатоген, *Cordyceps militaris*, плодовые тела, диапазон хозяев, Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera.

Features of mycelium and stromata formation of *Cordyceps militaris* were investigated under percutaneous or intra-haemocoel infection of different insect species. Stromata were produced on nonspecific hosts *Gryllus bimaculatus* Deg. (Orthoptera), *Pachnoda marginata* Drury (Coleoptera), *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera) under injection with submerged hyphal bodies into insect haemocoel. However percutaneous infection of the lepidopterans larvae by conidia (*G. mellonella*, *Malacosoma parallela* Staud., *Operophtera* sp.) led to anamorphic sporulation and the percentage of cadavers germinated by mycelium was low (<15 %).

Key words: entomopathogen, *Cordyceps militaris*, stromata, host-range, Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera.

Аскомицет *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link представляет интерес как продуцент биологически активных веществ для фармацевтической промышленности (Yu et al., 2006; Ikeda et al., 2008; Lee et al., 2008; Юй и др., 2010). Кроме того, ряд авторов (Sierpinska, 1998; Kamata, 2000; Крюков и др., 2010а) рассматривает данный вид в качестве одного из основных регуляторов численности массовых лесных филлофагов. В естественных условиях гриб связан преимущественно с чешуекрылыми насекомыми группы Macroheterocera, проводящими часть своего жизненного цикла в лесной подстилке или валежной древесине (Kobayasi, 1941; Борисов и др., 2005; Sierpinska, 1998; Kamata, 2000; Крюков и др., 2010а). Помимо чешуекрылых в качестве хозяев этого гриба указывались жуки рода *Ips* (Сукватова, 1987), комары рода *Tipula* (Müller-Kögler,

1965), пилильщики семейства Cimbicidae (Kobayasi, 1941; Крюков и др., 2010а).

Получение плодовых тел (телеоморфы) *C. militaris* в лабораторных условиях необходимо: для биомедицинских исследований, так как в литературе пока нет единого мнения о фармакологической ценности мицелия и стром гриба (Yu et al., 2006; Ikeda et al., 2008; Юй и др., 2010); для получения аскоспор, которые могут быть применимы в исследовании экологических предпочтений, жизненных циклов аскомицетов и закономерностей эпизоотийного процесса в популяциях насекомых; для поддержания активности музейных штаммов *C. militaris* на основе пассажей через хозяев.

Некоторым исследователям удавалось получить плодовые тела гриба на искусственных питательных средах, приготовленных на основе зерновых субстра-

тов (Kobayasi, 1941; Basith, Madelin, 1968; Choi et al., 1999; Sung et al., 1999, 2002; Shrestha et al., 2004), однако данные эксперименты оказывались не всегда воспроизводимыми. В частности, нами при культивировании западносибирских изолятов *C. militaris* на средах на основе риса, пшеницы, отрубей и различных добавок (растительные масла, почвенные вытяжки, остатки насекомых, культуры клеток насекомых) было получено только конидиальное спороношение гриба, иногда с появлением зачаточных стром без перитециев. Более стабильные результаты по культивированию стром были получены нами (Крюков и др., 2010а) и другими исследователями (Sato, Shimazu, 2002) при инфицировании лабораторных насекомых, в основном чешуекрылых.

Цель данной работы — исследовать особенности образования стром *C. militaris* на насекомых разных систематических групп, культивируемых в лабораториях или массово встречающихся в природе.

Материал и методы

В исследованиях использован природный изолят С-20, выделенный в 2007 г. в Новосибирской обл. во время грибной эпизоотии в популяциях чешуекрылых (Крюков и др., 2010а). Анаморфную культуру (*Lasani-cillium* sp.) сохраняли на среде Сабуро или Ваксмана (Литвинов, 1969) при 4 °С. Пересевы проводили 1—2 раза в год.

Конидии гриба получали на дважды автоклавированной смеси пшеницы и риса (Никольская, 1982; Крюков и др., 2010а) в соотношении 1 : 1 либо на среде Ваксмана. Нарботку погруженных гифальных тел гриба проводили путем инокуляции конидий в жидкую среду Чапека с пептоном (0,4 %) с последующим культивированием в шейкере при 110 об./мин и 25 °С в течение 8—10 суток. В ряде опытов использованы аскоспоры, которые получали путем гомогенизации стром гриба, собранных в природе или выращенных в лаборатории.

Для перкутанного заражения использовали гусениц зимней пяденицы (*Operophtera* sp.), горного кольчатого коконопряда (*Malacosoma parallela* Staud.), гусениц и куколок воштинной огневки (*Galleria mellonella* L.), личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) и перелетной саранчи (*Locusta migratoria* L.). Инфицирование осуществляли путем нанесения водной суспензии на поверхность кутикулы насекомых с титром 5×10^6 спор/мл. В контроле насекомых обрабатывали водой. Смертность учитывали на протяжении 15 суток. В каждом варианте эксперимента использовали не менее 30 особей.

Инъекции насекомых осуществляли суспензиями с титром 5×10^6 спор/мл с помощью микроинъектора. Укол производили между 3-м и 4-м либо 2-м и 3-м сегментами брюшка. Для куколок большого мучного хрущака (*Tenebrio molitor* L.) и воштинной огневки объем инъекции составлял 5 мкл. Для личинок последнего возраста и имаго двупятнистого японского сверчка (*Gryllus bimaculatus* Deg.), личинок IV возраста перелетной саранчи и пустынного пруса (*Calliptamus barbarus* Costa), личинок старшего возраста пра-

морного таракана (*Nauphoeta cinerea* Oliv.), личинок, куколок и имаго африканской бронзовки (*Pachnoda marginata* Drury), а также куколок горного кольчатого коконопряда объем инъекции составлял 50 мкл. После гибели насекомых выдерживали 4—8 суток в чашках Петри, а после мумификации обжигали в течение 2 с в пламени спиртовки и помещали в пластиковые контейнеры объемом 300 мл с увлажненным мхом сфагнум на дне (высота слоя — 1,5—2 см). В контейнерах поддерживали 90—99%-ю влажность на протяжении всего эксперимента (37—60 суток). Выращивание стром проводилось при температурах 15, 20, 25 и 30 °С и комнатной освещенности с длиной дня 9—10 ч. После формирования перитециев стромы высушивали при 35 °С в течение одной недели и взвешивали на весах с точностью до 0,001 г.

Результаты и обсуждение

При перкутанном заражении конидиями гриба личинок азиатской саранчи и колорадского жука смертности насекомых не отмечено, хотя на кутикуле *L. decemlineata* образовывались отчетливые меланистические пятна, свидетельствующие о проникновении гриба в кутикулу (Борисов и др., 2001). При этом же типе заражения гусениц чешуекрылых (*Operophtera* sp., *G. mellonella*) смертность составляла 25—30 %, однако в большинстве случаев у насекомых наблюдался нетипичный микоз, заканчивающийся разложением трупов. Не более 15 % погибших насекомых обрастали мицелием гриба, а формирования стром отмечено не было. Сходный эффект был получен ранее (Крюков и др., 2010а) при заражении конидиями *C. militaris* гусениц яблонной горностаевой моли (*Yponomeuta malinellus* Zell.). При инфицировании конидиями гусениц *M. parallela* наблюдалась их повышенная гибель от спонтанного микоза, вызванного *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Так, в контрольной группе смертность от спонтанного мускардиноза составила на 12-е сутки эксперимента 43 ± 9 %, а при заражении конидиями *C. militaris* — 93 ± 3 %. В последнем варианте только на 3 % погибших гусениц образовалось анаморфное спороношение *C. militaris*, тогда как на остальных 97 % отмечено образование мицелия и конидий *B. bassiana*.

При перкутанном заражении аскоспорами гусениц и куколок *G. mellonella* смертность насекомых не превышала 30 %, при этом трупы разлагались как при бактериальных инфекциях.

При инъекциях куколкам *G. mellonella* суспензии конидий или аскоспор *C. militaris* отмечена 90—100%-я гибель насекомых, но при этом мумификации трупов не наблюдалось. Микоз заканчивался разложением трупов. При интрагемоцеллюлярном введении гифальных тел, выращенных в глубинной культуре, куколкам *G. mellonella* отмечалась их 98%-я гибель на 3—4-е сутки с последующей мумификацией и образованием стром (см. таблицу). Стромы образовывались при температурах 15, 20 и 25 °С, при этом заметных отличий во времени созревания перитециев не наблюдалось. При 30 °С плодовые тела не образовывались.

Характер течения микоза у разных видов насекомых при инъекциях гифальных тел *Cordyceps militaris*, выращенных в глубинной культуре

Вид	Фаза	LT ₅₀ , сутки	Итоговая смертность (12 суток), %	Мумификация	Формирование стром, %	Созревание перитециев, сутки	Сухая масса стромы, мг	n
<i>Nauphoeta cinerea</i>	L	—	40	—	—	—	—	30
<i>Gryllus bimaculatus</i>	L	6	60	+	65	45—50	30 ± 4	20
	I	1	100	+	20	45—50	28 ± 6	20
<i>Locusta migratoria</i>	L	7	70	+	—	—	—	30
<i>Caliptamus barbarus</i>	L	3	95	—	—	—	—	30
<i>Tenebrio molitor</i>	P	2	95	+	—	—	—	50
<i>Pachnoda marginata</i>	L	3	100	+	—	—	—	10
	P	4	100	+	60	55—60	45 ± 12	20
	I	3	100	—	—	—	—	10
<i>Galleria mellonella</i>	P	2	98	+	92	33—37	21 ± 2	100
<i>Malacosoma parallela</i>	P	2	100	—	—	—	—	20

Примечание. L — личинки, P — куколки, I — имаго.

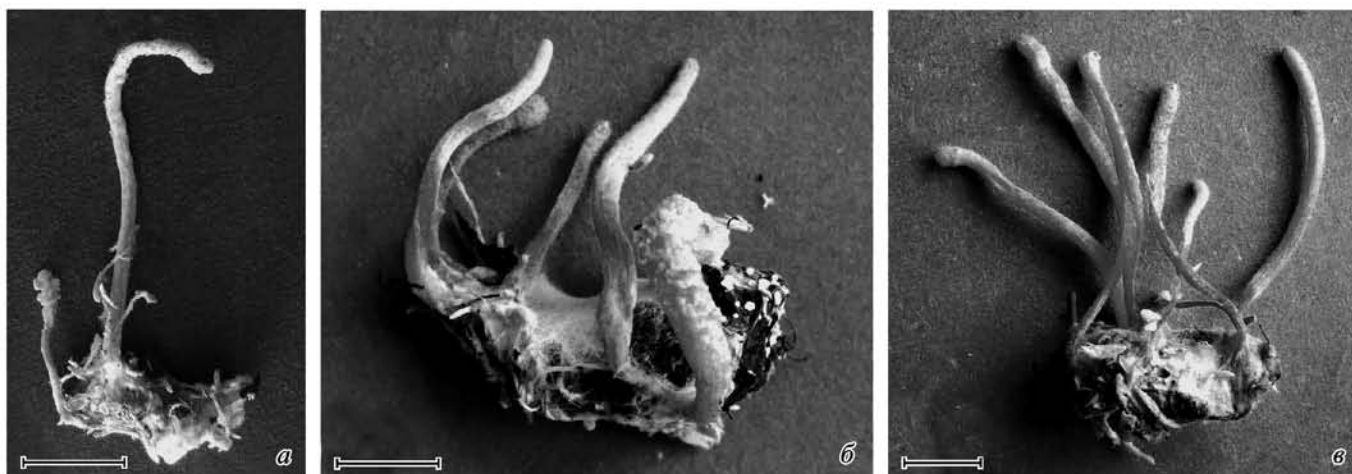
В дальнейших экспериментах по инъектированию насекомых использовали только суспензии погруженных гифальных тел гриба с последующим содержанием трупов при 20—25 °С. Используя данный метод, нам удалось получить стромы гриба на абсолютно неспецифических хозяевах — личинках и имаго *G. bimaculatus*, куколках *P. marginata* (см. рисунок). При культивировании гриба на данных объектах увеличивалась масса стром, но в то же время снижалась доля трупов насекомых, на которых они были образованы. Также отмечалось более позднее формирование перитециев (см. таблицу).

На остальных исследуемых объектах получить стромы гриба не удалось (см. таблицу). В данных тестах в основном наблюдалось нетипичное течение микоза с последующим разложением трупного материала. Мумификация отмечалась у личинок *P. marginata* и куколок *T. molitor*, однако при помещении мумий в увлажненный мох сфагнум происходил лизис гриба.

Полученные нами результаты частично согласуются с данными других исследователей. Shanog (1936) получил стромы *C. militaris* на куколках павлиноглазки (*Callosamia promethea* Drury) при введении гиф с помощью стерильной иглы. Sato, Shimazu (2003) получили

стромы японского штамма *C. militaris* на куколках чешуекрылых (*Mamestra brassicae* L., *Spodoptera litura* F. и *Bombyx mori* L.) после их инъекции гифальными телами, выращенными в глубинной культуре. В отличие от наших исследований этим авторам удалось получить стромы также на *T. molitor*. Возможно, это связано с различиями в специализации японских и сибирских штаммов *C. militaris*. Ряд исследователей (Harada et al., 1993) смогли получить стромы гриба при перкутанном заражении аскоспорами куколок *M. brassicae*. В наших экспериментах при данном заражении куколок *G. mellonella* развивался нетипичный микоз, заканчивающийся гибелью гриба вместе с хозяином. Однако отметим, что при помещении куколок *G. mellonella* в почву из эпизоотических очагов *C. militaris* на одной из погибших куколок (n = 20) развилась строма гриба (остальные оказались поражены грибами *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. или сапротрофами *Mucor* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.). Что касается возможности формирования стром *C. militaris* на насекомых с неполным превращением (сверчки), то подобные работы нам неизвестны.

Успешное течение микоза при инъекциях погруженных гифальных тел (а не аскоспор и конидий) гри-



Стромы *Cordyceps militaris* на куколках *Galleria mellonella* (а), *Pachnoda marginata* (б), *Gryllus bimaculatus* (в). Масштаб — 1 см.

ба, очевидно связано с тем, что в гемолимфу попадают инфекционные структуры, наиболее адаптированные к внутренней среде насекомого (Борисов, 1990; Sato, Shimazu, 2002). Конидии *C. militaris* при перкутанном заражении также обладают определенной вирулентностью, но лишь небольшой процент погибших гусениц обрастает мицелием, дающим анаморфное спороношение. Повышение чувствительности гусениц к другим грибным инфекциям при инфицировании *C. militaris* заслуживает дальнейшего всестороннего изучения этого гриба как синергиста энтомопатогенных грибов.

Таким образом, при интрагемоделилярном введении гифальных тел возможно возникновение микоза и формирование стром *C. militaris* на неспецифических хозяевах гриба: *G. bimaculatus*, *P. marginata*, *G. mellonella*. Это свидетельствует о том, что кутикулярные барьеры играют ведущую роль в трофической специализации патогена. Наиболее перспективным из исследуемых тест-объектов для культивирования стром *C. militaris* является *G. mellonella* по причине наиболее стабильного выхода плодовых тел и более раннего созревания перитециев. Соответственно мы можем рекомендовать *G. mellonella*, как вид, удобный для разведения в лабораторных условиях, который может использоваться для наработки стром, применяемых в биомедицинских и эпизоотологических исследованиях, а также для поддержания музейных штаммов *C. militaris*.

Работа частично поддержана грантами Президента РФ и Президиума СО РАН (№ 33).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Борисов Б. А. Проблемы создания и использования миконсектицидных препаратов // Докл. науч. симпози. СЭВ «Изучение энтомопатогенных микроорганизмов и разработка технологий производства и применения». Румыния, Бухарест: НИИЗР, 1990. С. 8—22.
- Борисов Б. А., Жирков В. М., Глухов В. В., Леднев Г. Р., Володина Л. И., Лиховидов В. Е., Соколов М. В. Роль Лазовского заповедника в сохранении биоразнообразия грибов сем. Clavicipitaceae — потенциальных продуцентов биопестицидов и фармацевтических препаратов // Тр. Лазовского государственного природного заповедника им. Л. Г. Капранова. 2005. Вып. 3. С. 27—56.
- Борисов Б. А., Серебров В. В., Новикова И. И., Бойкова И. В. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. В. В. Глухова. М.: Круглый год, 2001. С. 352—427.
- Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Леднев Г. Р., Борисов Б. А. Э Локальные эпизоотии, вызванные телеоморфными кордициптоидными грибами (Ascomycota: Нуроскреales) в популяциях лесных чешуекрылых и пилильщиков летне-осеннего комплекса в Сибири // Микология и фитопатология. 2010а. Т. 44, вып. 4. С. 315—328.
- Крюков В. Ю., Леднев Г. Р., Левченко М. В., Ярославцева О. Н., Макаров Е. М., Баймагамбетов Е. Ж., Дуйсембеков Б. А., Глухов В. В. Влияние различных наполнителей на биологическую эффективность энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* против саранчовых в условиях Казахстана // Агрохимия. 2010б. № 12. С. 26—30.
- Литвинов М. А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука, 1969. 115 с.
- Никольская Е. А. Культивирование грибов // Методы экспериментальной микологии / Под ред. В. И. Билай. Киев: Наук. думка, 1982. С. 106—137.
- Суковатова Л. М., Миловидова Л. С., Трубачева К. С. Обнаружение энтомопатогенного гриба *Cordyceps militaris* (Fr.) Lk. на юге Томского Приобья // Микология и фитопатология. 1987. Т. 21, вып. 6. С. 528—529.
- Юй Л., Тулигуэл, Хайин Б. *Cordyceps militaris* // Лекарственные грибы Китая в традиционной китайской медицине и современных биотехнологиях / Под ред. В. А. Сысуева. Киров: О-Краткое, 2009. С. 232—240.
- Basith M., Madelin M. F. Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture // Can. J. Bot. 1968. Vol. 46, N 4. P. 473—480.
- Choi I.-Y., Choi J.-S., Lee W.-H., Yu Y.-J., Jo-ung G.-T., Ju I.-O., Choi Y.-K. The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris* // Kor. J. Mycol. 1999. Vol. 27, № 4. P. 243—248.
- Harada Y., Akiyama N., Yamamoto K., Shiota Y. Production of *Cordyceps militaris* fruit body on artificially inoculated pupae of *Mamestra brassicae* in the laboratory // Nippon Kingakukai Kaiho. 1995. Vol. 36, N 2. P. 63—72.
- Ikeda R., Nishimura M., Sun Y., Wada M., Nakashima K. Simple HPLC-UV determination of nucleosides and its application to the authentication of *Cordyceps* and its allies // Biomed. Chromatogr. 2008. Vol. 22, N 5. 630—636.
- Kamata N. Population dynamics of the beech caterpillar, *Syntypistis punctatella*, and biotic and abiotic factors // Popul. Ecol. 2000. Vol. 42, N 3. P. 267—278.
- Kobayasi Y. The genus *Cordyceps* and its allies // Sci. Repts Tokyo Bunrika Daigaku. 1941. Vol. 5, N 84. P. 53—260.
- Lee H., Kim Y. J., Kim H. W., Lee D. H., Sung M.-K., Park T. Induction of apoptosis by *Cordyceps militaris* through activation of caspase-3 in leukemia HL-60 cells // Biol. Pharm. Bull. 2006. Vol. 29, N 4. P. 670—674.
- Müller-Kögler E. *Cordyceps militaris* (Fr.) Link: Beobachtungen und versuche anlässlich eines fundes auf *Tipula paludosa* Meig. (Diptera: Tipulidae) // Z. Angew. Entomol. 1965. Bd 55, H. 4. S. 409—418.
- Sato H., Shimazu M. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects // Appl. Entomol. Zool. 2002. Vol. 37, N 1. P. 85—92.
- Shanor L. The production of mature perithecia of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. in laboratory culture // J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 1936. Vol. 52, N 1. P. 99—104.
- Shrestha B., Kim H.-K., Sung G.-H., Spatafora J. W., Sung J.-M. Bipolar heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris* in vitro // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2004. Vol. 9, N 6. P. 440—446.
- Sierpinska A. Towards an integrated management of *Dendrolimus pini* L. // Population dynamics, impacts, and integrated management of forest defoliating insects / Eds M. L. McManus, A. M. Liebhold. Gen. Tech. Rep. NE-247, Radnor, PA: USDA Forestry Service, Northeastern Research Station, 1998. P. 129—142.
- Sung J.-M., Choi S.-Y., Lee H.-K., Kim S.-H., Kim Y.-O., Sung G.-H. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species // Kor. J. Mycol. 1999. Vol. 27, N 1. P. 15—19.
- Sung J.-M., Choi Y.-S., Shrestha B., Park Y.-J. Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris* // Kor. J. Mycol. 2002. Vol. 30, N 1. P. 6—10.
- Yu H. M., Wang B.-S., Huang S. C., Duh P.-D. Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage // J. Agr. Food Chem. 2006. Vol. 54, N 8. P. 3132—3138.