

УДК 574.24+591.69-57

ИЗМЕНЕНИЕ ВОСПРИИМЧИВОСТИ ГУСЕНИЦ *Galleria mellonella* К АНАМОРФНЫМ ЭНТОМОПАТОГЕННЫМ АСКОМИЦЕТАМ ПРИ ПАРАЛИЗАЦИИ ЭКТОПАРАЗИТОИДОМ *Habrobracon hebetor*

© 2013 г. В. Ю. Крюков, Н. А. Крюкова, В. В. Глулов

Институт систематики и экологии животных СО РАН

630091 Новосибирск, ул. Фрунзе, 11

E-mail: krukoff@mail.ru

Поступила в редакцию 04.06.2012 г.

Ключевые слова: микозы насекомых, Ascomycota, анаморфы, паразитоиды, восприимчивость, специализация.

DOI: 10.7868/S0367059713010071

Анаморфные энтомопатогенные аскомицеты *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium* представлены преимущественно низкоспециализированными видами, способными поражать сотни видов насекомых разных отрядов. Данные грибы имеют космополитическое распространение и обитают в самых разнообразных биоценозах. Их конидиоспоры находятся в почве, листовном опаде, валевой древесине, на поверхности и во внутренних тканях растений (Ownley et. al., 2010).

Для успешного заражения хозяев анаморфными энтомопатогенными грибами обычно требуются весьма высокие дозы, составляющие тысячи, десятки и даже сотни тысяч конидий на одну особь, но в природе воздействие на насекомых таких доз инфекции не может быть частым (Борисов и др., 2001). Однако эти дозы могут быть значительно снижены для насекомых, ослабленных такими факторами, как субоптимальные температуры, присутствие сопутствующих инфекций, воздействие синтетических инсектицидов. Особую роль в изменении чувствительности насекомых к энтомопатогенным грибам играют паразитоиды (Roy, Pell, 2000). Следует отметить, что большинство исследований в системе хозяин – энтомопатоген – паразитоид проводилось на моделях с использованием эндопаразитических перепончатокрылых (Roy, Pell, 2000). Лишь в немногих работах описаны изменения чувствительности хозяев к анаморфным грибам под воздействием эктопаразитоидов парализаторов (Draganova, Valevski, 2000).

Ранее нами было показано иммуносупрессивное действие яда *Habrobracon hebetor* Say на личинок *Galleria mellonella* L., проявляющееся в подав-

лении активности фенолоксидазы в гемолимфе, а также снижении уровня инкапсуляции (Kryukova et al., 2011). Поскольку данные показатели иммунитета могут быть связаны с устойчивостью к энтомопатогенам (Hajek, St. Leger, 1994), мы предположили, что парализация гусениц *H. hebetor* может повышать эффективность заражения аскомицетами.

Цель настоящей работы – оценить восприимчивость гусениц *Galleria mellonella* L. к грибам *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium* под влиянием парализации *Habrobracon hebetor* Say.

В работе использованы культуры энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana* s. l. (штамм Cap-31), *Metarhizium anisopliae* s. l. (штаммы P-72, Мак-1), *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. (штамм Pgm-2), *I. fumosorosea* Wize (штамм Pad-2). Конидии грибов нарабатывали общепринятыми методами на среде Сабуро.

Биотестирование проводилось на лабораторных популяциях *G. mellonella* и *H. hebetor*. К гусеницам V возраста *G. mellonella*, содержащихся в чашках Петри ($d = 90$ мм), на 14 ч подсаживали самок *H. hebetor* из расчета 3 самки на 10 гусениц. Затем на брюшко парализованных гусениц топикально наносили 5 мкл водной суспензии грибов с определенным титром конидий. В другой серии опытов личинок сначала инокулировали конидиями грибов, а через 2 сут к ним подсаживали самок *H. hebetor* на 14 ч. В контрольных вариантах нативных личинок *G. mellonella* инокулировали соответствующими дозами инфекции. Эксперименты включали также контрольные варианты без инфицирования грибами. Насекомых содержали при 28°C и 90–95% RH в темноте. Учеты

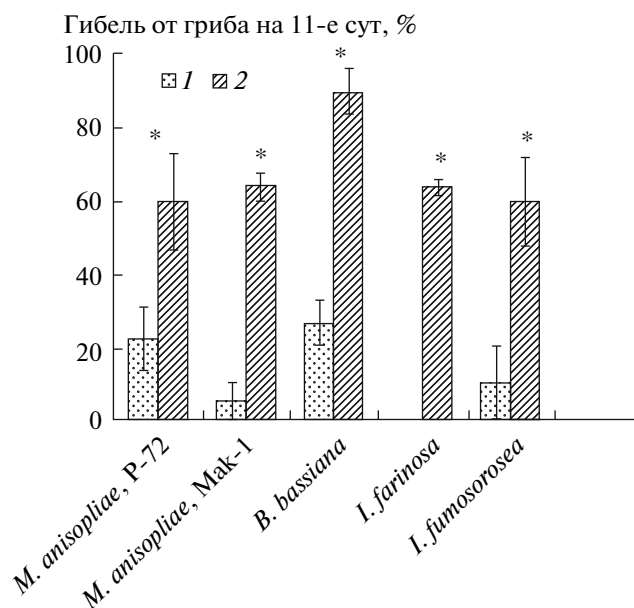


Рис. 1. Гибель от микозов у непарализованных (1) и парализованных *H. hebetor* (2) гусениц *G. mellonella* (титр – 2.5×10^5 кон/ос., $n = 30$, вертикальные линии – ошибки средних арифметических, * – $P < 0.05$). Гибель от микозов в необработанных грибами контролях – 0%.

смертности от грибов проводили на протяжении 11–15 сут.

Для определения LC_{50} грибов для гусениц *G. mellonella* использовали 7 доз – от 5×10^1 до 5×10^7 конидий на одну особь (кон/ос.) с шагом в один порядок.

Для установления влияния на развитие микоза личинок бракона, питающихся на парализованных гусеницах *G. mellonella*, гусениц содержали индивидуально в чашках Петри ($d = 60$ мм). Смыв конидий с гусениц, проросших мицелием грибов, осуществляли водой с добавлением Твина-20 (0.03%) с использованием шейкера (BioSan) при

3 тыс. об/мин. Затем проводили подсчет конидий с помощью гемоцитометра и пересчет их количества на одну погибшую гусеницу.

Достоверность отличий в смертности насекомых определяли с помощью двувыворочного t -теста, показатели LC_{50} – методом Спирмена-Кербера.

Установлено, что у гусениц, парализованных браконом, значительно увеличивается восприимчивость к тестируемым грибам (рис. 1). Так, авирулентный для *G. mellonella* штамм Pgm-2 *I. farinosa* привел к микозу $63 \pm 2\%$ парализованных личинок. Для остальных культур смертность при указанном титре увеличивалась у парализованных гусениц в 2.7–11.4 раза. Показано, что после парализации паразитоидом LC_{50} *B. bassiana* снижается почти в 5000 раз (рис. 2). Для успешного прохождения и завершения микоза была достаточной очень низкая доза инфекции (114 кон/ос.), при которой эффективное заражение нативных насекомых невозможно.

Присутствие или отсутствие личинок *H. hebetor*, питающихся на парализованных гусеницах *G. mellonella*, не влияло на исход грибного заболевания. Так, у парализованных, но не зараженных браконами гусениц доля колонизированных и впоследствии проросших мицелием *B. bassiana* составила 96% ($n = 56$), а у зараженных гусениц – 95% ($n = 41$). Как правило, личинки бракона питались на гусенице одновременно с колонизацией ее тела грибом, затем они плели коконы рядом

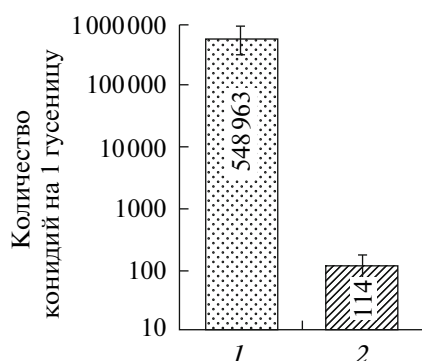


Рис. 2. LC_{50} *B. bassiana* для незараженных (1) и зараженных *H. hebetor* (2) гусениц *G. mellonella* ($n = 240$, вертикальные линии – 95%-ные доверительные интервалы).

с хозяином или на некотором расстоянии от него. За это время гусеница полностью колонизировалась грибом. Личинки старших возрастов или куколки паразитоида обычно (в 79% случаев) погибали и в последующем обрастали мицелием гриба. Продукция дочернего поколения конидий гриба на гусеницах, зараженных и незараженных браконом, достоверно не различалась ($P > 0.05$) и составляла в среднем $1.4 \pm 0.25 \times 10^8$ кон/ос. Не выявлено зависимости между количеством личинок браконов (от 0 до 6), закончивших питание на пораженных грибом гусеницах, и урожайностью конидий на трупах *G. mellonella* ($r = 0.05$, $p = 0.83$, $n = 21$).

В последующих экспериментах проводили сравнительную оценку смертности гусениц от *B. bassiana* в зависимости от того, когда гриб попадает на кутикулу насекомых: до или после парализации браконом. В условиях, когда гриб попал на кутикулу после парализации паразитоидом, микоз проходил более успешно и быстро (рис. 3), однако и в том случае, когда парализация происходила после инокуляции грибом, смертность от микоза достоверно увеличивалась по сравнению с вариантом без парализации ($p < 0.01$).

Ранее было обнаружено повышение восприимчивости гусениц чешуекрылых к энтомопатогенным аскомицетам при заражении эндопаразитоидами *Microplitis croceipes* Cres. (Braconidae) (King, Bell, 1978), *Oomyzus sokolowskii* Kurd. (Eulophidae) (Dos Santos et al., 2006), а также под действием яда *Pimpla hypochondriaca* Retz. (Ichneumonidae) (Dani et al., 2004). В.Р. Ел-Суфти и Е. Фухрнер (El-Sufty, Führer, 1981a, б) показали, что заражение эндопаразитоидом *Apanteles glomeratus* L. (Braconidae) личинок белянки *Pieris brassicae* L. усиливает проникновение гриба *B. bassiana* через кутикулу гусениц. Однако после проникновения гриба через покровы микоз развивался медленнее из-за фунгистатических свойств гемолимфы, обусловленных присутствием в ней личинок *Apanteles*. Сходные тенденции были отмечены этими же авторами (El-Sufty, Führer, 1981b, 1985) на модели *Cydia pomonella* L. (Tortricidae) — *Ascogaster quadridentatus* Wesm. (Braconidae) — *B. bassiana*. Следует отметить, что гусеницы огневки *Plodia interpunctella* Hbn., зараженные *H. hebetor*, значительно активнее инвазировались энтомопатогенными нематодами *Heterorhabditis* по сравнению с незараженными гусеницами (Mbata, Shapiro-Ilan, 2010).

На модели *G. mellonella* — *H. hebetor* — *B. bassiana* ранее не отмечалось повышения чувствительности к аскомицету у зараженных браконом гусениц (Draganova, Valevski, 2000), что, вероятно, было связано с использованием высоких доз патогена (LT₉₀ — 6 сут). Проведенное нами исследо-

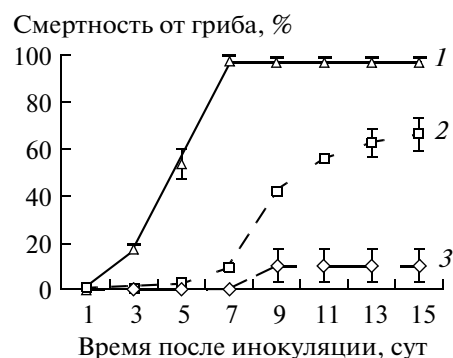


Рис. 3. Динамика смертности от микоза *B. bassiana* при инокуляции грибом до и после парализации *H. hebetor*. 1 — парализация, а через 14 ч инокуляция; 2 — инокуляция, а через 48 ч парализация; 3 — только инокуляция. Титр — 500 кон/ос., $n = 50$. Вертикальные линии — ошибки средних арифметических. Гибель от микозов в необработанных грибами контролях — 0%.

вание с использованием пониженных титров инфекции и авирулентных культур показало резкое повышение восприимчивости к энтомопатогенным грибам у гусениц, парализованных *H. hebetor*. Мы предполагаем, что подобные явления могут быть широко распространены и в природе. Так, если хозяин в момент парализации контактирует с субстратом, несущим конидии грибов, либо сублетальная грибная инфекция уже развивалась в/на кутикуле насекомого, то вероятность колонизации его тела грибом значительно увеличится. В случае открыто живущих хозяев при нападении паразитоида высока вероятность того, что обездвиженная жертва может оказаться на поверхности почвы, служащей резервуаром для энтомопатогенных аскомицетов. При этом для успешного развития микоза будет достаточно небольшого количества конидий. Кроме того, известно, что число парализованных паразитоидами хозяев превышает число тех, на которых в последующем будут отложены яйца (Тобиас, 2004), что увеличивает количество ресурса для развития энтомопатогенов.

В заключение отметим, что низкая специализация анаморфных энтомопатогенных грибов, вероятно, сопряжена с поражением ими особей, значительно ослабленных различными факторами среды, и в частности пораженных ядами перепончатокрылых.

Работа поддержана грантами Президиума СО РАН, РФФИ и Президента РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Борисов Б.А., Серебров В.В., Новикова И.И., Бойкова И.В. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты // Патогены насекомых: структурные и

- функциональные аспекты / Под ред. Глупова В.В. М.: Круглый год, 2001. С. 352–427.
- Тобиас В.И. Паразитические насекомые-энтомофаги, их биологические особенности и типы паразитизма // Труды РЭО. 2004. Т. 75. Вып. 2. С. 1–148.
- Dani M.P., Richards E.H., Edwards J.P. Venom from the pupal endoparasitoid, *Pimpla hypochondriaca*, increases the susceptibility of larval *Lacanobia oleracea* to the entomopathogens *Bacillus cereus* and *Beauveria bassiana* // J. Invertebr. Pathol. 2004. V. 86. № 1–2. P. 19–25.
- Dos Santos H.J.G., Marques E.J., Barros R., Gondim M.G.C. Interaction of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and the Parasitoid *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov) (Hymenoptera: Eulophidae) with Larvae of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) // Neotrop. Entomol. 2006. V. 35. № 2. P. 241–245.
- Draganova S., Balevski N. Mycosis of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized by *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) // Acta Entomol. Bulg. 2000. V. 6. № 1–2. P. 29–33.
- El-Sufly R., Führer E. Wechselbeziehungen zwischen *Pieris brassicae* L. (Lep., Pieridae), *Apanteles glomeratus* L. (Hym., Braconidae) und dem Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. // Z. Ang. Ent. 1981a. V. 92. № 1–5. P. 321–329.
- El-Sufly R., Führer E. Parasitäre Veränderungen der Wirtskutikula bei *Pieris brassicae* und *Cydia pomonella* durch entomophage endoparasiten // Ent. Exp. & Appl. 1981b. V. 30. № 2. P. 134–139.
- El-Sufly R., Führer E. Wechselbeziehungen zwischen *Cydia pomonella* L. (Lep., Tortricidae), *Ascogaster quadridentatus* Wesm. (Hym., Braconidae) und dem Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. // Z. Ang. Ent. 1985. V. 99. № 1–5. P. 504–511.
- Hajek A.E., St. Leger R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts // Ann. Rev. Entomol. 1994. V. 39. P. 293–322.
- King E.G., Bell J.V. Interactions between a braconid, *Microplitis croceipes*, and a fungus, *Nomuraea rileyi*, in laboratory-reared bollworm larvae // J. Invertebr. Pathol. 1978. V. 31. № 3. P. 337–340.
- Kryukova N.A., Dubovskiy I.M., Chertkova E.A. et al. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae // J. Insect Physiol. 2011. V. 57. № 6. P. 796–800.
- Mbata G.N., Shapiro-Ilan D.I. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) // Biol. Contr. 2010. V. 54. № 2. P. 75–82.
- Ownley B.H., Gwinn K.D., Vega F.E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution // BioControl. 2010. V. 55. № 1. P. 113–128.
- Roy H.E., Pell J.K. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for biological control // Biocontr. Sci. Techn. 2000. V. 10. № 6. P. 737–752.