

УДК 632.937.14:632.727(574)

## ВЛИЯНИЕ НАПОЛНИТЕЛЕЙ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОМАССЫ КОНИДИЙ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA* ПРОТИВ САРАНЧОВЫХ В УСЛОВИЯХ КАЗАХСТАНА\*

© 2010 г. В.Ю. Крюков<sup>1</sup>, Г.Р. Леднев<sup>2</sup>, М.В. Левченко<sup>2</sup>, О.Н. Ярославцева<sup>1</sup>,  
Е.М. Макаров<sup>3</sup>, Е.Ж. Баймагамбетов<sup>3</sup>, Б.А. Дуйсембеков<sup>3</sup>, В.В. Глупов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт систематики и экологии животных СО РАН  
630091 Новосибирск, ул. Фрунзе, 11, Россия

<sup>2</sup>Всероссийский институт защиты растений РАСХН  
196608 Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, Россия

<sup>3</sup>Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений  
040924 п. Рахат, Карасайский р-н, Алматинская обл., Казахстан  
E-mail: krukoff@mail.ru

Поступила в редакцию 13.01.2010 г.

В Юго-Восточном Казахстане изучена динамика смертности саранчовых под воздействием конидий гриба *Beauveria bassiana* (Bals.–Criv.) Vuill. при различной солнечной освещенности. Установлено, что в условиях затенения (4–6 тыс. лк) уровень смертности личинок *Locusta migratoria* L. составлял 100%, тогда как при освещенности, близкой к естественной (80 тыс. лк), – лишь 40–45%. Добавление фото-протекторов (цеолита, оксида цинка, активированного угля, гумата натрия) в водные суспензии конидий *B. bassiana* увеличивало инсектицидную активность гриба до 50–70% по отношению к личинкам II–III возрастов *L. migratoria* и *Callipatus barbarus* (Costa). Показано, что при использовании масляных суспензий возможно увеличение биологической активности *B. bassiana* до 70–80% по отношению к личинкам 4–5-го возрастов *L. migratoria*, *Ramburiella turcomana* (F.–W.) и *Oedaleus decorus* (Germ.) при освещенности, близкой к 80 тыс. лк.

*Ключевые слова:* энтомопатогенные грибы, конидии, фотопротекторы, солнечная инсоляция, инсектицидная активность, саранчовые.

### ВВЕДЕНИЕ

Препараты, разработанные на основе энтомопатогенных грибов, достаточно широко используют для подавления численности саранчовых в ряде стран мира [1, 2]. Как правило, они находят применение в “экологически чувствительных зонах”, где использование химических инсектицидов невозможно: рекреационные и водоохранные зоны, населенные пункты, районы производства экологически чистой продукции и др. [3]. Однако использование энтомопатогенных грибов против саранчовых сопряжено с рядом трудностей, связанных с нестабильностью их действия. В первую очередь это обусловлено такими лимитирующими факторами аридного климата как солнечная инсоляция, высокая температура и низкая влажность. Известно, что под действием прямого солнечного света конидии грибов теряют жизнеспособность в

течение нескольких часов, что приводит к значительному снижению эффективности микоинсектицидных биопрепаратов [4–8]. Поэтому актуальным представляется поиск наполнителей – протекторов энтомопатогенных грибов. В нескольких исследованиях показана перспективность использования таких наполнителей как глины, гуматы, активированный уголь, диоксид титана, оксид цинка, флуорисцентные отбеливатели (Tinopal LPW, Blankophor BSU), растительные и минеральные масла, меласса, сухое молоко, яичный альбумин и др. [9–12]. Данные протекторы могут различаться по своей эффективности в зависимости от видов используемых микромицетов, целевых объектов и среды их обитания. Следует отметить, что на территории СНГ исследования протекторов энтомопатогенных грибов в условиях аридных зон не проводили.

При испытании энтомопатогенных грибов против саранчовых в условиях Юго-Восточного Казахстана авторами было отмечено, что на освещенных солнцем участках смертность нимф оказывается значительно ниже по сравнению с затененными местами.

\* Работа поддержана грантами “Интеграция” СО РАН № 46 и Президента РФ № МК–1431.2009.4.

Это вызвало необходимость поиска и тестирования различных наполнителей микоинсектицидных препаратов. Авторами были подобраны вещества, являющиеся потенциальными протекторами грибов и в то же время обладающие доступностью и относительно невысокой себестоимостью: гумат натрия, оксид цинка, активированный уголь, цеолит, подсолнечное масло. Цель работы – оценка динамики смертности массовых саранчовых от грибной инфекции при различной солнечной освещенности, скрининг протекторов *Beauveria bassiana* (Bals.–Criv.) Vuill., а также оценка эффективности водной и масляной суспензий конидий гриба.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено в 2006–2009 гг. в Юго-Восточном Казахстане на базе НИИ защиты и карантина растений РК. В работе использован штамм ББК-1, выделенный из погибших особей итальянского пруса *Callipamus italicus* (L.) в 2000 г. на юге Новосибирской обл. (окрестности г. Карасук) и показавший высокую вирулентность для различных видов саранчовых в лабораторных экспериментах [13, 14].

Конидиальную массу гриба нарабатывали методом двухфазного культивирования. Сначала проводили глубинное культивирование гриба в среде Чапека [15] с пептоном (0.4%) в шейкере при 120 об./мин. и 24 °С в течение 6 сут. Затем инокулят (4 мл) вносили на дважды автоклавированное пшено в чашки Петри (диаметр 150 мм) и инкубировали в термостате при 24 °С в течение 3–3.5 нед. Полученную биомассу гриба сушили 2 нед при комнатной температуре и затем перемалывали с помощью кофемолки. Титр жизнеспособных спор определяли методом серийных разведений и последующим высевом на агаризованные питательные среды Чапека или Ваксмана [16].

Исследования проведены на личинках разных возрастов и имаго азиатской саранчи *Locusta migratoria migratoria* L., пустынного и итальянского прусов *Callipamus barbarus* (Costa) и *C. italicus*, а также видах *Ramburiella turcomana* (F.–W.) и *Oedaleus decorus* (Germ.).

Для оценки влияния инсоляции на биологическую эффективность *B. bassiana*, насекомых заражали путем погружения на 5–6 сек в водную суспензию конидий гриба с определенным титром. Затем обработанных особей помещали в садки из мельничного газа размером 25 × 25 × 50 см, расположенные на открытом участке, где уровень освещенности составлял – 100 тыс. лк (с учетом экранирования ткани – 80 тыс. лк) и под кронами деревьев (уровень освещенности – 5–8 тыс. лк, с учетом экранирования ткани – 4–6 тыс. лк). При

изучении влияния протекторов на эффективность гриба насекомых заражали вышеописанным способом, но с добавлением в суспензию конидий того или иного протектора (2.5%), после чего насекомых содержали в садках при 80 тыс. лк. При изучении эффективности водных и масляных суспензий насекомых обрабатывали в станциях их пребывания с помощью ранцевого атомайзерного опрыскивателя Micronair AU 8000. Инфекционную нагрузку вносили из расчета  $5 \times 10^{12}$  конидий/га. Обработку проводили в вечерние часы. Утром насекомых собирали энтомологическим сачком и помещали в описанные выше садки, где интенсивность освещенности составляла 80 тыс. лк. В каждом варианте опыта использовали не менее 60 насекомых (трехкратная повторность по 20 особей). Учеты гибели насекомых проводили в течение 16–25 сут в зависимости от уровня смертности. В период проведения экспериментов среднесуточные температуры составляли 26–31 °С (минимум – 20 °С, максимум – 43 °С), влажность – 40–50%, при этом отмечена преимущественно безоблачная погода.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ уровня смертности личинок старших возрастов азиатской саранчи при различных уровнях освещенности выявил следующую особенность. В садках, находящихся в затененном месте (4–6 тыс. лк) гибель хозяина была существенно выше по сравнению с расположенными на открытом участке (80 тыс. лк). Смертность саранчи к 25-м сут после заражения при затенении составила 100% (рис. 1).

В то же время при интенсивной солнечной освещенности величина данного показателя к этому сроку не превышала 40%. Выявленная закономерность, на наш взгляд, может быть обусловлена следующими обстоятельствами. Во-первых, при

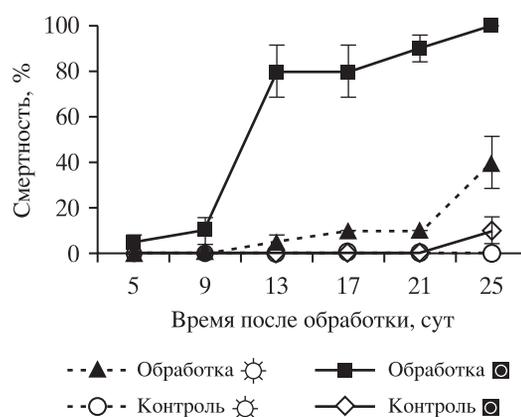
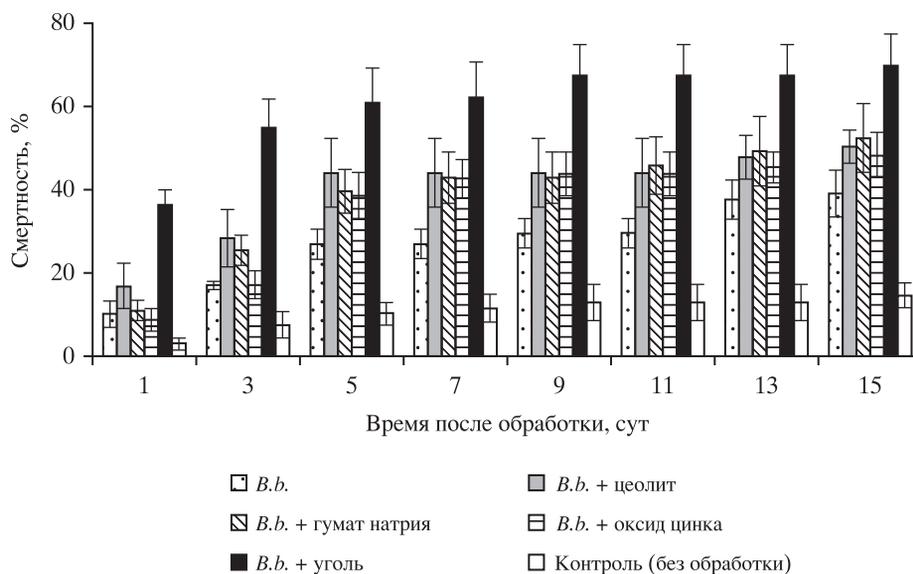


Рис. 1. Динамика смертности личинок IV–V возрастов *Locusta migratoria* под воздействием водной суспензии *Beauveria bassiana* (титр  $5 \times 10^7$  конидий/мл) на освещенных солнцем (☀ – 80 тыс. лк) и затененных (■ – 4–6 тыс. лк) участках. Вертикальные линии – ошибка среднего арифметического. То же на рис. 2, 3.



**Рис. 2.** Смертность личинок II–III возрастов *Calliptamus barbarus* при применении *Beauveria bassiana* (титр водной суспензии  $1 \times 10^7$  конидий/мл) и добавлении различных наполнителей (2.5%).

высокой инсоляции и температуре происходит гибель конидий, не проникших в полость тела в течение первых 16 ч после заражения. Во-вторых, указанные условия тормозят развитие инфекции уже в полости тела хозяина. Рядом авторов показано [17], что при заражении энтомопатогенными грибами азиатская саранча изменяет свой режим терморегуляции, выбирая наиболее освещенные и обогреваемые участки, в результате чего значительно замедляется развитие грибной инфекции.

Эксперименты по влиянию фото-протекторов на активность *B. bassiana* по отношению к личинкам II–III возрастов пустынного пруса показали, что при добавлении в суспензию конидий гриба окиси цинка, гумата натрия и цеолита смертность насекомых увеличивалась на 15–25%, а при добавлении активированного угля – на 30–35% по сравнению с чистой суспензией конидий гриба (рис. 2).

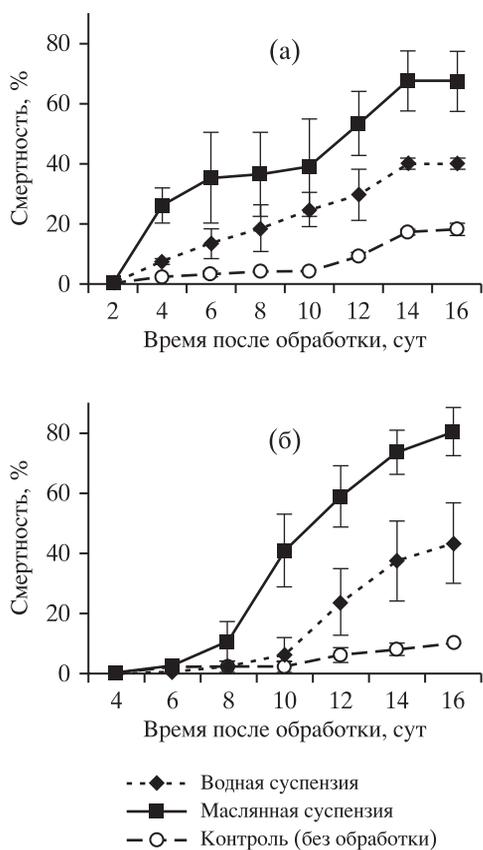
Отмечено, что при обработке суспензией, включавшей только активированный уголь, может наблюдаться 35–45%-ная смертность личинок, тогда как при обработке другими протекторами регистрировалась смертность на уровне 15–25%, что сопоставимо с контролем. Сходные данные получены при обработке личинок младших возрастов (II–III) азиатской саранчи. Важно отметить, что при исследовании влияния данных протекторов на активность гриба в отношении личинок старших возрастов (IV–V) саранчовых (азиатской саранчи, итальянского пруса) значимых отличий в смертности насекомых не выявлено. Во всех вариантах, включая обработку только грибом, наблюдали смертность на уровне 40–45% на 16–19-е сут эксперимента. Таким образом, использование данных

протекторов гриба против старших возрастов саранчовых оказалось неэффективным.

В связи с этим было проведено сравнение биологической активности водной и масляной суспензий гриба против личинок IV–V возрастов азиатской саранчи, а также личинок и имаго *R. turcomana* и *O. decorus*. Насекомые были обработаны в местах их пребывания (степи и полупустыни в Прибалхашье) с помощью атомизерного опрыскивателя, затем собраны и помещены в садки для учета смертности. Установлено, что масляные суспензии показали существенно большую биологическую эффективность по сравнению с водными (рис. 3).

Гибель 40% особей при обработке водной суспензией регистрировали на 14–15-е сут, тогда как при обработке масляной суспензией – уже на 8–9-е сут. Биологическая эффективность масляных суспензий (по учетам на 16–17-е сут после обработки) оказалась на 30–40% больше по сравнению с водными.

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, показавшими более высокую эффективность масляных суспензий по сравнению с водными в экспериментах, поставленных на разных видах саранчовых [1, 11, 18–20], а также других членистоногих [21–23]. Очевидно, масло защищает конидии грибов не только от солнечной радиации, но и от высыхания, а также повышает их адгезивные свойства [1]. Биологическая эффективность масляных суспензий *B. bassiana* в проведенных авторами экспериментах была сопоставима с подобными испытаниями на различных видах саранчовых в Африке [11]. В дан-



**Рис. 3.** Динамика смертности личинок IV–V возрастов *Locusta migratoria* (а), личинок V возраста и имаго комплекса *Ramburiella turcomana* + *Oedaleus decorus* (б) при обработке водной и масляной суспензиями конидий *Beauveria bassiana* ( $5 \times 10^{12}$  конидий/га).

ных работах использование масляной суспензии конидий штамма IMI 330189 *M. anisopliae* var. *acridum* (основа биопрепарата Green Muscle™) приводило к 90–98%-ной смертности *L. migratoria*, *Cryptocatantops haemorrhoidalis* (Krauss) и *Hieroglyphus daganensis* (Krauss). Таким образом, эффективность указанных биологических испытаний была на 10–28% больше по сравнению с данным экспериментом. В связи с этим перспективным представляется дальнейшее совершенствование препаративной формы микоинсектицида.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, против саранчовых в условиях аридных зон Казахстана показана 70–80%-ная биологическая эффективность экспериментальных препаратов, приготовленных на основе *B. bassiana* и при использовании фото-протекторов энтомопатогенных грибов. При обработке личинок младших возрастов в качестве протекторов возможно использование активированного угля, старших возрастов – масляных суспензий. Дальнейшие иссле-

дования должны быть направлены на поиск более дешевых растительных или минеральных масел и маслорастворимых протекторов энтомопатогенных грибов. Перспективным является скрининг высоко-вирулентных штаммов по признакам устойчивости к солнечной инсоляции, высоким температурам и низкой влажности.

Авторы признательны д.б.н. М.Г. Сергееву и д.б.н. А.Г. Бугрову (ИСиЭЖ СО РАН) за помощь в идентификации личинок саранчовых, к.б.н. И.М. Дубовскому (ИСиЭЖ СО РАН), акад. А.О. Сагитову и всем сотрудникам лаборатории биотехнологии КазНИИЗиКР за помощь в организации экспериментов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lomer C.J., Bateman R.P., Johnson D.L., Lagewald J., Thomas M. Biological control of locusts and grasshoppers // Annu. Rev. Entomol. 2001. V. 46. P. 667–702.
2. Charnley A.K., Collins S.A. Entomopathogenic fungi and their role in pest control // Environmental and microbial relationships. The Mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research / Eds. C.P. Kubicek, K. Esser and I.S. Druzhinina. Springer, 2007. P. 159–187.
3. Лачининский А.В., Сергеев М.Г., Чильдебаев М. К., Черняховский М.Е., Локвуд Дж.А., Камбулин В.Е., Гаптаров Ф.А. Саранчовые Казахстана, Средней Азии и сопредельных территорий. Ларамы: МАПА и Ун-т Вайоминга, 2002. 387 с.
4. Громовых Т.И. Энтомопатогенные грибы в защите леса. Новосибирск: Наука, 1982. 80 с.
5. Inglis G.D., Johnson D.L., Goettel M.S. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Sympodulosporea) of grasshoppers under field conditions // Environ. Entomol. 1997. V. 26. P. 400–409.
6. Braga G.U.L., Flint S.D., Messias C.L., Anderson A.J., Roberts D.W. Effect of UV-B on conidia and germings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae* // Mycol. Res. 2001. V. 105. № 7. P. 874–882.
7. Braga G.U.L., Flint S.D., Miller C.D., Anderson A.J., Roberts D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S // J. Invertebr. Pathol. 2001. V. 78. P. 98–108.
8. Wraight S.P., Inglis G.D., Goettel M.S. Fungi // Field manual of techniques in invertebrate pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Springer, 2007. P. 223–248.
9. Inglis G.D., Goettel M.S., Johnson D.L. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* // Biol. Contr. 1995. V. 5. № 4. P. 581–590.

10. Edgington S., Segura H., de La Rosa W., Williams T. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: testing simple formulations for control of the coffee berry borer // Int. J. Pest Manag. 2000. V. 46. № 3. P. 169–176.
11. Kassa A. Development and testing of mycoinsecticides based on submerged spores and aerial conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of locusts, grasshoppers and storage pests. Doctoral diss. Göttingen: Georg-August-University, 2003. 170 p.
12. Inglis G.D., Goettel M.S., Erlandson M.A., Weaver D.K. Grasshoppers and locusts // Field manual of techniques in invertebrate pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Springer, 2007. P. 627–654.
13. 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 грибов (Deuteromycota, Hyphomycetes) для регуляции численности насекомых // Евраз. энто-мол. журн. 2007. Т. 6. № 2. С. 195–204.
14. Lednev G.R., Kryukov V.Yu., Khodyrev V.P., Levchenko M. A., Duisembekov B.A., Sagitov A.O., Glupov V.V. Dynamics of mortality of the migratory locust under synchronous infection with entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) and bacteria *Pseudomonas* sp. // Contemp. Probl. Ecol. 2008. V. 1. № 2. P. 210–213.
15. Бойкова И.В., Новикова И.И. Выделение энтомопатогенных дейтеромицетов // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. Глупова В.В. М.: Круглый год, 2001. С. 698–708.
16. Лутвинов М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука, 1969. 115 с.
17. Ouedraogo R.M., Goettel M. S., Brodeur J. Behavioral thermoregulation in the migratory locust: a therapy to overcome fungal infection // Oecologia. 2004. V. 138. P. 312–319.
18. Bateman R.P., Carey M., Moore D., Prior C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities // Ann. Appl. Biol. 1993. V. 122. P. 145–152.
19. Hernandez-Velazquez V.M., Berlanga-Padilla A.M., Barrientos-Lozano L. Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* to control the central american locust (*Schistocerca piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae) // J. Orthoptera Res. 2000. № 9. P. 223–227.
20. Hernandez-Velazquez V.M., Hunter D.M., Barrientos-lozano L., Lezama-Gutierrez R., Reyes-Villanueva F. Susceptibility of *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes): laboratory and field trials // J. Orthoptera Res. 2003. V. 12. № 1. P. 89–92.
21. Prior C., Jollands P., Le-Patourel G. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae) // J. Invertebr. Pathol. 1988. V. 52. P. 66–72.
22. Moslim R., Wahid M.B., Ali S.R.A., Kamarudin N. The effects of oils on germination of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and its infection against the oil palm bagworm, *Metisa plana* (Walker) // J. Oil Palm Res. 2004. V. 16. № 2. P. 78–87.
23. Hedimbi M., Kaaya G.P., Singh S., Chimwamurombe P.M., Gindin G., Glazer I., Samish M. Protection of *Metarhizium anisopliae* conidia from ultra-violet radiation and their pathogenicity to *Rhipicephalus evertsi* ticks // Exp. Appl. Acarol. 2008 V. 46. № 1–4. P. 149–156.

## Biological Activity of Different Formulations of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* against Locusts and Grasshoppers of Kazakhstan

V.Yu. Kryukov<sup>1</sup>, G.R. Lednev<sup>2</sup>, M.A. Levchenko<sup>2</sup>, O.N. Yaroslavtseva<sup>1</sup>,  
E.M. Makarov<sup>3</sup>, E.Zh. Bajmagambetov<sup>3</sup> B.A. Dujsembekov<sup>3</sup> and V.V. Glupov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, ul. Frunze 11, Novosibirsk, 630091 Russia*

<sup>2</sup>*All-Russian Institute of Plant Protection, Russian Academy of Agricultural Sciences, sh. Podbelskogo 3, St. Peterburg-Pushkin, 196608 Russia*

<sup>3</sup>*Kazakh Research Institute of Plant Protection and Quarantine, Rakhat, Karasaiskiy district, Almaty region, 040924 Kazakhstan*

Mortality dynamics of locusts infected with the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.–Criv.) Vuill. under different solar illumination intensity in Southeastern Kazakhstan was studied. The 100% mortality rate of *Locusta migratoria* L. nymphs was registered under shaded conditions (4000–6000 lx), and only the 40–45% mortality rate was recorded under the solar illumination close to the natural one (80 000 lx). The addition of ultraviolet protectors (zeolite, zinc oxide, activated carbon, sodium humate) to the aqueous suspension of *Beauveria bassiana* conidia increased the insecticidal activity up to 50–70% against II–III instars of both *Locusta migratoria* and *Callipamus barbarus* (Costa). It was shown that the use of oil suspensions of *Beauveria bassiana* conidia led to the 70–80% mortality rate of IV–V instars of *Locusta migratoria*, as well as the complex of locusts *Ramburiella turcomana* (F.–W.) and *Oedaleus decorus* (Germ.) under solar illumination corresponding to 80 000 lx. **Keywords:** biological activity, different photoformulations, entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, locusts, grasshoppers, Kazakhstan.