

## ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 582.288 : 574.24

© В. Ю. Крюков, И. М. Дубовский, О. Н. Ярославцева, М. В. Левченко, Н. Д. Слямова,  
А. Б. Белгибаева, В. П. Ходырев, Г. Р. Леднев, В. В. Глупов

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДВУХ ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *METARHIZIUM ANISOPLIAE* С РАЗНЫМИ ЖИЗНЕННЫМИ СТРАТЕГИЯМИ

KRYUKOV V. Yu., DUBOVSKIY I. M., YAROSLAVTSEVA O. N., LEVCHENKO M. V.,  
SLYAMOVA N. D., BELGIBAEVA A. B., KHODYREV V. P., LEDNEV G. R.,  
GLUPOV V. V. COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO STRAINS OF ENTOMOPATHOGENIC  
FUNGUS *METARHIZIUM ANISOPLIAE* WITH DIFFERENT PATHOGENESIS STRATEGIES

В процессе эволюции у энтомопатогенных микромицетов выработались различные стратегии взаимоотношений с хозяевами, причем в пределах вида или группы близких видов можно выделить популяции, которым свойственны разные стратегии. Ряд авторов (Борисов, 1990; Борисов и др., 2001) указывает, что большинство патогенов использует стратегию так называемого умеренного потребления ресурсов. Они характеризуются средним уровнем вирулентности, обладают высокой продуктивностью и жизнеспособностью. В то же время в природе встречаются и высоковирулентные штаммы, обладающие обычно повышенным токсинообразованием, но уступающие первым в других жизненно важных свойствах — продуктивности конидиообразования, выживаемости конидий во внешней среде и др. Поэтому вспышки заболеваний от таких форм не бывают длительными. В российской литературе (Борисов, 1990; Воронина, 1997; Яркулов и др., 2006) первую стратегию обозначают как эпизоотийную (обеспечивающую преемственность эпизоотического процесса), вторую — как токсигенную (действие сходно с разовым эффектом после применения химических инсектицидов). В зарубежных работах (Kershaw et al., 1999; Charnley, 2003) первую стратегию называют стратегией роста, что связано с постепенной колонизацией тела насекомого грибами и активным спороношением на трупах. Вторую — стратегией токсина, когда гибель насекомых происходит преимущественно от токсикоза и спороношение на трупах отмечается реже или отсутствует. Упомянутые авторы считают, что данные стратегии являются крайними вариантами континуума, и между ними располагается ряд промежуточных форм. Различия в стратегиях могут выявляться как у разных видов энтомопатогенных грибов, так и у внутривидовых форм (патовариантов, штаммов) и также могут быть связаны с их трофической специализацией (Kershaw et al., 1999; Charnley, Collins, 2007).

При реализации энтомопатогенными грибами данных стратегий важное значение имеет длительность течения микозов. С одной стороны, показано, что некоторые штаммы, проявляющие определенную трофическую специализацию к какой-либо группе насекомых-хозяев, вызывают у них скоротечную болезнь с высокой смертностью. Так, методом направленной селекции путем пассажей патогена через специфических хозяев можно добиться значительного сокращения инкубационного периода болезни (Полтев и др., 1969; Вейзер, 1972; Fargues, Robert, 1983; Воронина, Чума-

кова, 1994). С другой стороны, во многих случаях для грибов более «выгодным» оказывается длительное, а не быстрое течение микозов, поскольку лишь в данном случае возможно образование многочисленного дочернего поколения конидий на погибших насекомых (Борисов, 1990; St. Leger et al., 1996; St. Leger, 2007; Крюков и др., 2007).

Динамика развития инфекционного процесса и способность поражать определенные группы насекомых определяются не только факторами вирулентности возбудителей, но и защитными реакциями хозяев. Показана ключевая роль в защите насекомых процессов меланизации и инкапсуляции патогенов, направленных на их уничтожение на начальных стадиях роста в теле зараженных хозяев (Глулов и др., 2001). Кроме того, существенно тормозить развитие микозов вплоть до полного прекращения могут механизмы детоксикации экзометаболитов патогенов (Серебров и др., 2001, 2006). Основными ферментативными системами насекомых, участвующими в процессе детоксикации различных ксенобиотиков, являются монооксигеназы, эстеразы и глутатион-S-трансфераза (ГСТ) (Li et al., 2007).

В данной работе мы исследовали штаммы анаморфного энтомопатогенного аскомицета *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin. Этот вид способен поражать сотни видов насекомых из разных отрядов, при этом он имеет сложную внутривидовую структуру, представленную популяциями, приуроченными к определенным типам биоценозов, и патовариантами с различной степенью специализации к насекомым-хозяевам (Fargues, Robert, 1983; Bidochka et al., 2001; Roberts, St. Leger, 2004; St. Leger, 2007; Wang et al., 2009, и др.). Показано, что трофическая специализация *M. anisopliae* связана преимущественно с особенностями адгезии и проникновения гриба через кутикулу хозяев (Charnley, 2003). Также известно, что патоварианты, приспособленные к определенным группам насекомых (например, *M. anisopliae* var. *acridum* — к саранчовым, *M. anisopliae* var. *majus* — к пластинчатоусым жукам), обычно проявляют стратегию роста, тогда как менее специализированные формы (*M. anisopliae* var. *anisopliae*) чаще характеризуются токсигенной стратегией (Kershaw et al., 1999). Отметим, что механизмы данных стратегий остаются плохо изученными. В частности, недостаточно изучен вопрос о факторах вирулентности штаммов с разными стратегиями, неизвестно, на каких стадиях развития гриба происходит элиминация токсигенных штаммов в погибших хозяевах, каковы взаимоотношения токсигенных и ростовых (эпизоотийных) штаммов друг с другом и сопутствующей микробиотой насекомых, какое значение имеют защитные реакции хозяев при инфицировании данными штаммами.

При тестировании активности ряда коллекционных культур *M. anisopliae*, выделенных в разных природно-климатических зонах бывшего СССР из различных насекомых, нами было обращено внимание на уникальные патогенные свойства одного из штаммов (P-72), который вызывал высокую скоротечную гибель насекомых из разных отрядов, но при этом не образовывал дочернего поколения конидий на погибших хозяевах, за исключением некоторых видов Lepidoptera. Стратегию данного штамма мы условно назвали токсигенной. Имея культуру такого необычного штамма, представляло интерес изучить его культуральные признаки, особенности патогенеза у разных насекомых, защитные реакции хозяев, а также сопоставить с другим штаммом (МАК-1), вызывающим более длительные микозы у насекомых и обильно продуцирующим конидии на трупах хозяев из разных отрядов. Его стратегия условно была обозначена как ростовая.

Цель настоящей работы — провести сравнительное исследование патогенных и культуральных свойств штаммов *M. anisopliae* (P-72, МАК-1), изучить ряд показателей защитных систем насекомых, связанных с клеточным иммунитетом и детоксицирующей системой при инфицировании данными культурами.

## Материал и методы

В работе использованы культуры двух штаммов *M. anisopliae* из коллекций микроорганизмов Института систематики и экологии животных СО РАН и Всероссийского института защиты растений.

Штамм Р-72 изолирован в 1972 г. из погибших личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) в Латвии (Serebrov et al., 2007). Для этого штамма характерна высокая стабильность макроморфологических признаков при пересевах на искусственных питательных средах (ИПС). Структура колоний на средах Чапека и Ваксмана (Литвинов, 1969) порошистая, цвет — оливково-зеленый. Иногда в старых культурах наблюдался вторичный рост в виде белого или серого неспорносящего мицелия. Размер конидий —  $6.4 \pm 0.07 \times 3.5 \pm 0.05$  мкм.

Штамм МАК-1 выделен в 2000 г. на юге Новосибирской обл. из погибших особей итальянского пруса *Calliptamus italicus* L. (Orthoptera: Acrididae) (Леднев, Левченко, 2004). Он имеет порошистую структуру колоний, иногда образует небольшие (до 0.6—0.8 см) рыхлые синемы. Цвет колоний темно-бурый в центре и буро-желтоватый по краям. При пересевах и реинокуляции иногда образуются колонии желтого цвета. Размер конидий —  $7.1 \pm 0.09 \times 3.6 \pm 0.06$  мкм.

Исследуемые культуры сохраняли на агаризированных средах Чапека, Сабуро и Ваксмана при 4 °С. Пересевы проводили 1—2 раза в год.

Наработку конидиальной массы грибов для заражения насекомых осуществляли на дважды простерилизованном в автоклаве пшене по методике Е. А. Никольской (1982) с некоторыми изменениями (Ктуков et al., 2009). Титр конидий определяли под микроскопом с помощью камеры Горяева.

Для изучения вирулентности грибов были использованы насекомые из природных популяций Прибалхашья и Западной Сибири: личинки IV—V возрастов азиатской саранчи *Locusta migratoria* L. и *Dociostaurus* sp., личинки II—III возрастов пустынного пруса *Calliptamus barbarus* Costa (Orthoptera: Acrididae), личинки III—IV возрастов колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*, гусеницы II—III возрастов крапивницы *Aglais urticae* L. (Lepidoptera: Nymphalidae), яблонной горностаевой моли *Yponomeuta malinellus* Zell. (Lep.: Yponomeutidae) и американской белой бабочки *Nyphantria cunea* Dr. (Lep.: Arctiidae). Кроме того, биотестирование проводили и на лабораторных популяциях следующих видов насекомых: личинках IV—V возрастов большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* L. (Col.: Tenebrionidae), гусеницах III—IV возрастов большой вошинной огневки *Galleria mellonella* L. (Lep.: Pyralidae) и имаго мухи *Protophormia terraenovae* R.-D. (Diptera: Calliphoridae). Большинство указанных насекомых заражали методом погружения в водные суспензии грибов с титром  $1 \times 10^7$  или  $5 \times 10^6$  конидий/мл. Личинок *Tenebrio molitor* и *Galleria mellonella* инфицировали методом опыливания в закрытых контейнерах объемом 100 мл, при этом использовали навески высушенной грибной биомассы, содержащие  $1 \times 10^9$  конидий. Личинок чешуекрылых и *Tenebrio molitor* содержали в стеклянных чашках Петри диаметром 90 мм, остальных насекомых — в пластиковых контейнерах объемом 700 мл, накрытых капроновой сеткой. Учеты смертности проводили ежедневно в течение 18—20 суток. Эксперименты ставили не менее чем в трех повторностях, используя по 10—15 особей насекомых на каждую. Погибших насекомых раскладывали в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу с целью подсчета процента особей, обросших мицелием *M. anisopliae*, и для определения продуктивности конидий на трупах.

Для определения скорости прорастания конидий использовали посев водных суспензий на тонкие пластины голодного агара. Проросшие и непроросшие конидии подсчитывали под микроскопом через 24 и 48 ч после посева и затем вычисляли их процентное соотношение. Для оценки скорости радиального роста колоний из 4-суточных культур, выросших в чашках Петри, асептически вырезали пробойником агаровые блоки диаметром 8 мм и помещали их на поверхность стерильной агаризованной среды Чапека в центр стеклянных чашек Петри диаметром 9 см. Диаметр колоний измеряли каждые 2 суток. При изучении динамики роста грибов в глубинной культуре использовали жидкую среду Чапека с пептоном (0.4 %). В колбы емкостью 250 мл с 60 мл среды вносили по 1 мл суспензии с титром  $5 \times 10^6$  конидий/мл. Затем культуры инкубировали на ротационном шейкере при 110 об./мин. Титр бластоспор определяли через 3 и 6 суток опыта. Все опыты по динамике роста проводили при 27 °С.

В ряде экспериментов использовали среды, приготовленные из разных видов насекомых, а также на основе пшеничных отрубей. Для этого 3 г высушенной и измельченной массы насекомых или отрубей заливали 100 мл воды и кипятили на водяной бане 40 мин. После остывания до 25 °С в среды добавляли 2 г агар-агара и стерилизовали в автоклаве при 1 атм. 25 мин.

Для определения липазной и протеазной активности штаммов использовали агаризированные среды с добавлением Твина-20 или обезжиренного молока соответственно (Павлюшин, 1979). Измерение колоний и зон протеолиза и липолиза проводили через 4 суток после посева. Ферментативную активность выражали отношением диаметра зон вокруг колоний к диаметру самих колоний.

Для сравнения токсичности культуральной жидкости (КЖ) проводили глубинное культивирование штаммов по вышеописанной методике. Через 3 и 6 суток культивирования бластоспоры осаждали на центрифуге при 20 тыс. г в течение 10 мин. Надосадочную жидкость в объеме 5 мкл вводили в гемоцель гусениц V возраста *Galleria mellonella* (n = 40) с помощью микроинъектора. Показателем токсичности служил процент парализованных гусениц.

Выделение бактерий из погибших насекомых проводили по общепринятой методике (Вейзер, 1972) после стерилизации поверхности гусениц этиловым спиртом и быстрым обжиганием в пламени спиртовки. Каждую гусеницу гомогенизировали в 2 мл 0.65%-го раствора NaCl. Рассев бактерий проводили на мясо-пептонный агар (МПА). Виды идентифицировали по определителю бактерий Берджи (Определитель..., 1997). Антагонизм грибов и бактерий изучали методом агаровых блоков (Литвинов, 1969). Блоки среды МПА диаметром 9 мм с 2-суточной культурой бактерий помещали на свежепосеянные газоны грибов на среде Ваксмана. Зоны угнетения роста грибов измеряли через 6 суток.

Активность неспецифических эстераз и ГСТ в лимфе и жировом теле личинок колорадского жука оценивали через 3 суток после заражения грибами. В эти же сроки определяли интенсивность инкапсуляции в гемолимфе и фенолоксидазную активность в лимфе насекомых.

Гомогенаты жирового тела насекомых готовили в 0.1 М Na-фосфатном буфере (ФБ) с pH 7.2. На одну повторность использовали 1 личинку. Извлеченные органы гомогенизировали с холодным ФБ в соотношении 0.06 г тканей на 1 мл буфера с помощью ультразвукового гомогенизатора. Затем гомогенаты центрифугировали при 4 °С 15 мин при 10 тыс. g. Полученный супернатант использовали для определения активности детоксицирующих ферментов.

Гемолимфу отбирали стеклянным капилляром через надрез в кутикуле и помещали в охлажденные пробирки с ФБ. С целью предотвращения меланизации гемолимфы в пробирки добавляли фенилтиомочевину (до насыщения — 4 мкг/мл). Гемолимфу центрифугировали при 4 °С 5 мин при 500 g, после чего полученный свободный от клеток супернатант использовали для определения активности детоксицирующих ферментов.

Интенсивность инкапсуляции оценивали по степени потемнения нейлоновых имплантантов (Dubovskiy et al., 2008a). Активность неспецифических эстераз и ГСТ определяли спектрофотометрически (Серебров и др., 2001; Dubovskiy et al., 2008b). Фенолоксидазную активность в лимфе определяли спектрофотометрически по образованию дофахрома. Для этого 10 мкл образца смешивали с 200 мкл раствора dl-дигидрооксифенилаланина (4 мг/мл ФБ) и инкубировали при 28 °С 50 мин. Удельную активность фенолоксидаз выражали в единицах изменения оптической плотности ( $\Delta A$ ) инкубационной смеси при 490 нм в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

Концентрацию белка в лимфе и гомогенатах тканей определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Полученные данные представлены в виде средних арифметических и их ошибок. Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро—Уилка. Статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента с помощью программы STATISTICA 6.0.

## Результаты и обсуждение

Патогенные свойства. При сравнительной оценке вирулентности штаммов по отношению к насекомым из разных отрядов было установлено, что после инфицирования МАК-1 время гибели 50 % ( $LT_{50}$ ) и 90 % ( $LT_{90}$ ) особей наступало на несколько суток позднее, чем после заражения культурой P-72 (табл. 1). Итоговая смертность насекомых при заражении МАК-1 была несколько ниже, но в большинстве случаев достоверно не отличалась от таковой при инфицировании P-72 ( $P > 0.05$ ). Наибольшие различия в вирулентности штаммов наблюдались при заражении чешуекрылых. Так, штамм P-72 для *Huphantria cunea* и *Yponomeuta malinellus* был в 4—6 раз более вирулентным, чем МАК-1.

На большинстве исследуемых насекомых штамм МАК-1 завершал свое развитие обильным конидиеобразованием. Лишь обрастание трупов *Huphantria cunea* и *Ypono-*

Таблица 1

**Вирулентность и способность завершать жизненный цикл  
у штаммов P-72 и МАК-1 на разных видах насекомых**

Тест-насекомые	Штаммы	Титр конидий	$LT_{50}$ , сутки	$LT_{90}$ , сутки	Итоговая смертность, %	Обросшие мицелием трупы, %
Orthoptera						
<i>Locusta migratoria</i>	P-72	$1 \times 10^7$	8	10	100	0
	МАК-1		11	14	$95 \pm 2$	90
<i>Calliptamus barbarus</i>	P-72	$1 \times 10^7$	4	6	100	0
	МАК-1		6	8	100	28
<i>Dociostaurus</i> sp.	P-72	$1 \times 10^7$	5	6	100	0
	МАК-1		7	9	100	65
Coleoptera						
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	P-72	$1 \times 10^7$	4	9	100	0
	МАК-1		9	13	$90 \pm 7$	73
<i>Tenebrio molitor</i>	P-72	$1 \times 10^9$	9	—	$74 \pm 12$	0
	МАК-1		11	—	$65 \pm 9$	98
Lepidoptera						
<i>Aglais urticae</i>	P-72	$1 \times 10^7$	5	8	$95 \pm 5$	0
	МАК-1		15	—	$59 \pm 9$	15
<i>Huphantria cunea</i>	P-72	$1 \times 10^7$	4	—	$73 \pm 7$	0
	МАК-1		—	—	$16 \pm 8$	0
<i>Yponomeuta malinellus</i>	P-72	$1 \times 10^7$	7	—	$66 \pm 15$	96
	МАК-1		—	—	$10 \pm 6$	0
<i>Galleria mellonella</i>	P-72	$1 \times 10^9$	10	—	$66 \pm 8$	97
	МАК-1		12	—	$58 \pm 1$	100
Diptera						
<i>Protophormia terraenovae</i>	P-72	$5 \times 10^6$	8	13	100	0
	МАК-1		13	—	$52 \pm 5$	52

Примечание. Количество особей на вариант опыта: Orthoptera и Diptera — 60, Coleoptera — 45, Lepidoptera — 40.





Рис. 1. Продольный разрез тела мумифицированных личинок и куколок *Tenebrio molitor*, погибших от штаммов Р-72 (слева) и МАК-1 (справа).

*meuta malinellus* мицелием не было отмечено. Однако это может быть связано с тем, что смертность этих видов регистрировалась только на начальных этапах микоза (1—4-е сутки) и была очень низкой (10—16 %).

При инфицировании культурой Р-72 большинство видов исследуемых насекомых не обрастало мицелием. Часть особей погибала еще до формирования грибом склероциев. Например, при заражении *Locusta migratoria* доля таких особей составляла 45 %, а от штамма МАК-1 погибало только 10 %. В целом при заражении штаммом Р-72 с признаками мумификации погибало от 30 (*Calliptamus barbarus*) до 99 % (*Tenebrio molitor*) особей. Склероцины, формируемые культурой Р-72, отличались от таковых МАК-1 более темным цветом и большим количеством пустот, особенно в районе кишечника (рис. 1). Установлено, что на стадии образования склероциев Р-72 еще сохраняет жизнеспособность. Так, при гомогенизации мумифицированных куколок и личинок с последующим посевом на ИПС регистрировался нормальный рост гриба. Гибель склероциев происходила уже в условиях повышенной влажности. Во влажных камерах через 4—5 суток отмечался лизис гриба и разжижение мумий. При микробиологическом анализе этих трупов установлено, что в них доминировали бактерии *Pseudomonas* sp. (в *L. migratoria*), *Enterobacter aerogenes* Horm.-Ed. (в *T. molitor*), *Serratia grimesii* Grimont et al., *Serratia* sp., *Erwinia* sp. (в *L. decemlineata*). Реже на погибших насекомых поселялись сапротрофные грибы *Mucor* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bainier.

Формирование конидиального спороношения штамма Р-72 отмечено только на чешуекрылых *Uromyeta malinellus* и *Galleria mellonella*, однако конидиеобразование на мумиях этих насекомых было слабым (рис. 2). Так, на трупах личинок V возраста *G. mellonella* продуктивность Р-72 оказалась в 6 раз ниже, чем МАК-1:  $18 \times 10^6$  и  $110 \times 10^6$  конидий на одну погибшую гусеницу соответственно ( $P < 0.001$ ). Отметим, что появление спороношения у штамма Р-72 наблюдалось лишь через 5—6 суток после помещения мумий во влажные камеры, тогда как у МАК-1 — уже через 2—3 суток.

Нами было проведено исследование смешанной инфекции, сочетающей оба штамма *M. anisopliae* на личинках V возраста *Locusta migratoria*. Установлено, что динамика смертности зараженных личинок при смешанной (Р-72 + МАК-1) инфекции не отличается от таковой при монозаражении Р-72 (рис. 3). Как в случае монозаражения

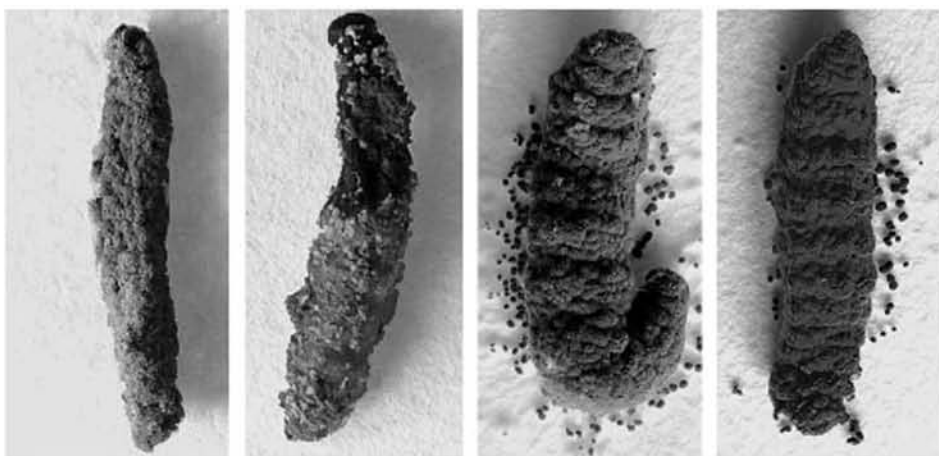


Рис. 2. Спороношение штаммов P-72 (слева) и МАК-1 (справа) на погибших гусеницах V возраста *Galleria mellonella*.

P-72, так и при бинарной инфекции ни одна из погибших личинок не обросла грибным мицелием. Таким образом, при данной смешанной инфекции в зараженных особях происходило конкурентное вытеснение ростового (эпизоотийного) штамма токсигенным, но в конечном итоге вместе с хозяином погибали оба патогена.

Культуральные свойства штаммов. С целью изучения факторов вирулентности и особенностей жизненного цикла исследуемых штаммов был проведен ряд тестов на различных ИПС. Установлено что для штамма P-72 требуется гораздо меньший период активации конидий на голодном агаре (табл. 2). При глубинном культивировании более активный рост в первые 3 суток наблюдался также у культуры P-72. Однако к 6-м суткам у штамма МАК-1 титр бластоспор возрос до такого же уровня, как и у P-72, т. е. различия между ними нивелировались. По показателям радиального роста на агаризированных ИПС МАК-1 опережал P-72.

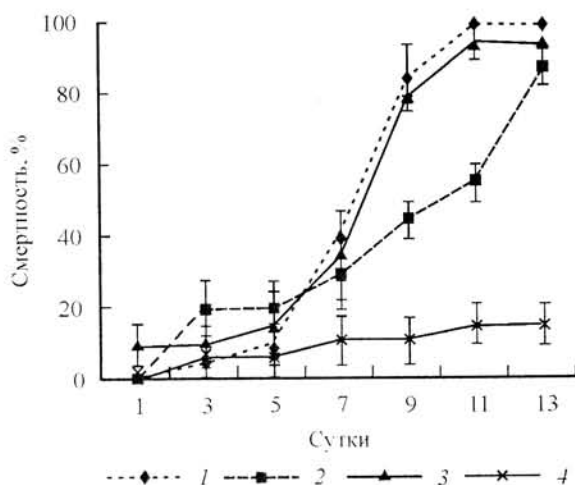


Рис. 3. Динамика смертности личинок V возраста *Locusta migratoria* после заражения штаммами P-72 ( $10^7$  конидий/мл), МАК-1 ( $10^7$  конидий/мл) и их смесь ( $5 \times 10^6 + 5 \times 10^6$  конидий/мл).

1 — P-72, 2 — МАК-1, 3 — P-72 + МАК-1, 4 — контроль.

Культуральные свойства штаммов *Metarhizium anisopliae* P-72 и МАК-1

Признаки	Штаммы		P
	P-72	МАК-1	
Параметры роста			
Прорастание конидий на голодном агаре через 24/48 ч, %	96 ± 1.0/99 ± 0.5	2 ± 1.6/40 ± 9.8	<0.01/<0.01
Продукция бластоспор в 1 мл глубинной культуры на среде Чапека через 3 / 6 суток (×10 <sup>6</sup> )	28 ± 2.2/100 ± 9.0	12 ± 3.2/120 ± 15.3	<0.05/>0.05
Диаметр колоний на агаризированной среде Чапека через 10 / 25 суток, мм	32 ± 0.4/81 ± 0.2	38 ± 0.3/83 ± 0.8	<0.01/<0.05
Продуктивность конидиеобразования на разных средах (×10 <sup>6</sup> )			
В 1 мг среды из пшена через 16 суток	7 ± 1.5	4 ± 1.9	<0.05
На 1 см <sup>2</sup> среды Чапека через 14 суток	73 ± 10.1	21 ± 2.4	<0.05
На 1 см <sup>2</sup> среды Сабуро через 14 суток	33 ± 9.0	21 ± 2.5	>0.05
На 1 см <sup>2</sup> среды из отрубей через 14 суток	75 ± 4.1	5 ± 1.6	<0.01
На 1 см <sup>2</sup> среды из гусениц <i>G. mellonella</i> через 14 суток	27 ± 5.7	31 ± 10.2	>0.05
На 1 см <sup>2</sup> среды из личинок <i>L. decemlineata</i> через 14 суток	10 ± 2.9	11 ± 1.9	>0.05
На 1 см <sup>2</sup> среды из личинок <i>L. migratoria</i> через 14 суток	0	23 ± 3.9	<0.01
Ферментативная активность (у. е.)			
Липазы	2.07 ± 0.07	2.90 ± 0.04	<0.05
Протеазы	1.52 ± 0.05	1.39 ± 0.09	>0.05

Важно отметить, что для штамма P-72 характерна более высокая продуктивность конидий на синтетических и приготовленных на основе компонентов растительного происхождения средах (см. табл. 2). В то же время на средах из насекомых значимых различий между культурами либо не регистрировалось, либо более продуктивным оказывался штамм МАК-1. Например, на среде из азиатской саранчи P-72 образовывал скудный и абсолютно неспороносящий мицелий, тогда как МАК-1 на данной среде оказался высоко продуктивным.

Штамм МАК-1 по сравнению с P-72 проявил достоверно более высокую липолитическую активность (см. табл. 2). Протеолитическая активность, напротив, оказалась несколько выше у штамма P-72, однако различия в данном случае были недостоверными.

Сравнительная оценка токсичности КЖ, отфильтрованной от грибной биомассы после глубинного культивирования, показала, что при инъекции в гемоцель гусениц *Galleria mellonella* 3- и 6-суточной КЖ штамма P-72 у всех особей (n = 40) происходит паралич, продолжающийся 45—60 мин, после чего гусеницы снова становятся подвижными и возобновляют питание. Данное явление, по всей видимости, связано с действием деструксинов, выделенных в питательную среду (Chamley, 2003). При инъекции 3-суточной КЖ штамма МАК-1 данное явление не наблюдалось, а при инъекции 6-суточной КЖ паралич отмечен лишь у 6 % гусениц. Это свидетельствует о повышенном токсинообразовании у P-72 и подтверждает факт токсигенной стратегии данного штамма.

Мы предполагали, что отсутствие дочерней конидиальной инфекции на трупах насекомых, зараженных штаммом P-72, может быть связано с антагонистическим действием некрофильных бактерий, колонизирующих мумии. Однако анализ этих свойств выделенных бактерий по отношению к обоим штаммам показал отсутствие



Показатели активности клеточного, гуморального иммунитета и компонентов детоксицирующей системы в гемолимфе (Г), лимфе (Л) и жировом теле (Ж) личинок IV возраста *Leptinotarsa decemlineata* через 3 суток развития грибной инфекции

Оценочные параметры	Ткани и их составляющие	Контроль	Штаммы	
			P-72	МАК-1
Интенсивность инкапсуляции (у. е.)	Г	37.45 ± 3.15	26.8 ± 2.01*	32.75 ± 2.88
Фенолоксидазная активность (у. е.)	Л	0.061 ± 0.008	0.086 ± 0.012	0.081 ± 0.005
Активность неспецифических эстераз (у. е.)	Л	0.494 ± 0.05	0.630 ± 0.039*	0.406 ± 0.038
	Ж	12.21 ± 0.51	18.29 ± 1.34*	13.76 ± 1.33
Активность глутатион-S-трансферазы (у. е.)	Л	0.018 ± 0.002	0.031 ± 0.003*	0.013 ± 0.002
	Ж	0.089 ± 0.005	0.122 ± 0.011*	0.093 ± 0.008

Примечание. n = 20; звездочка —  $p < 0.01$  по сравнению с контролем.

различий. Бактерия *Pseudomonas* sp. вызывала угнетение роста и конидиогенеза у обоих штаммов *M. anisopliae*. При этом рост МАК-1 подавлялся данной бактерией несколько сильнее, чем P-72: зоны отсутствия роста мицелия составили 8.1 и 6.5 мм соответственно ( $P > 0.05$ ). Все остальные выделенные бактерии (см. выше) не проявили антагонизма к обоим штаммам гриба.

Активность детоксицирующей системы и иммунных реакций у насекомых при развитии инфекции. Проведен анализ активности процесса инкапсуляции в гемолимфе, фенолоксидазной активности в лимфе и компонентов детоксицирующей системы — неспецифических эстераз и ГСТ в лимфе и жировом теле личинок колорадского жука через 3 суток после заражения исследуемыми культурами *M. anisopliae*. Установлено достоверное ( $p < 0.01$ ) 1.5-кратное подавление процесса инкапсуляции в варианте с заражением P-72 по сравнению с контролем (табл. 3). Фенолоксидазная активность в лимфе зараженных личинок достоверно не изменялась. Зарегистрировано достоверное 1.3—1.5-кратное увеличение активности неспецифических эстераз в лимфе и жировом теле насекомых, зараженных P-72. Кроме того, установлено увеличение активности ГСТ в 1.4—1.7 раза в жировом теле и лимфе личинок, зараженных этим штаммом. Следует отметить, что при заражении насекомых МАК-1 не наблюдалось достоверных изменений активности иммунных реакций и ферментов детоксицирующей системы (см. табл. 3).

Более высокие темпы гибели насекомых под действием штамма P-72 по сравнению с МАК-1, по всей видимости, связаны с меньшим периодом активации конидий, а также с высоким уровнем токсинообразования. Ранее для штаммов *M. anisopliae* была установлена корреляция между вирулентностью и скоростью прорастания конидий на агаризованных средах (Ferton, 1981). Также хорошо известна взаимосвязь между вирулентностью энтомопатогенных грибов и продукцией токсинов (Митина и др., 1997; Charnley, 2003; St. Leger, 2007; Wang et al., 2009).

Результаты нашей работы согласуются с данными, полученными Кершо с соавторами (Kershaw et al., 1999). Эти исследователи показали что штаммы, выделенные из саранчовых (как *M. anisopliae* var. *acridum*, так и *M. anisopliae* var. *anisopliae*), могут вызывать высокую смертность Acrididae без участия в этом деструктинов и завершать цикл развития обильным спороношением на мумиях хозяев. Кроме того, эти штаммы оказывались низко- или авирулентными для чешуекрылых. Напротив, штаммы, отличающиеся высоким уровнем токсинообразования, были высоковирулентными для чешуекрылых, а при заражении саранчовых их гибель часто происходила не собственно от микоза, а в большей мере от всплеска развития сопутствующей условно-патогенной микрофлоры.

Установлено, что элиминация токсигенного штамма в (на) насекомом может происходить на разных стадиях жизненного цикла гриба. Гибель патогена может наблюдаться до формирования склероция, т. е. на стадиях проникновения гриба через кутикулу и формирования бластоспор в гемолимфе. Если склероций все же формируется, гриб оказывается неспособным давать спороношение на мумиях насекомых. Если прорастание гиф через кутикулу и формирование конидий происходит (что наблюдается только на определенных хозяевах), то продуктивность гриба оказывается низкой.

Факты гибели энтомопатогенных грибов до стадии формирования склероция достаточно хорошо известны в литературе (Борисов, 1990; Яркулов и др., 2006). Это явление так называемого опережающего токсикоза, когда гибель хозяина наступает гораздо раньше окончания процесса колонизации его тела грибом, что чаще всего наблюдается при заражении насекомых высоковирулентными токсигенными культурами или средневирulentными штаммами в высоких дозах, приводящих к быстрой (в пределах 1—5 суток) гибели насекомых. В связи с этим в природе большее селективное преимущество имеют средневирulentные формы, вызывающие длительный микоз и заканчивающие свой жизненный цикл обильным спороношением на трупах (Борисов, 1990).

Что касается гибели склероциев и низкой продуктивности конидий на погибших насекомых, мы предполагаем, что это связано с особенностями усвоения грибом тканей хозяина. В частности, нами показано отсутствие спороношения у токсигенного штамма на среде из азиатской саранчи. Слабое конидиеобразование на насекомых, погибших от токсигенных штаммов (в том числе трансгенных), также отмечалось рядом исследователей (St. Leger et al., 1996; Pava-Ripoll et al., 2008).

В целом токсигенный штамм лучше развивался на синтетических и растительных питательных средах. Напротив, у штамма МАК-1 более высокая продуктивность отмечена на насекомых и некоторых средах из них. Это говорит о более высокой адаптации МАК-1 к зоотрофному питанию.

Данные, полученные нами при анализе детоксицирующей системы насекомых при развитии микозов, свидетельствуют о более выраженном ответе защитных систем хозяина на инфекцию, вызванную токсигенным штаммом. В частности, установлено увеличение активности неспецифических эстераз и ГСТ в жировом теле и лимфе колорадского жука. Не исключено, что повышенная активность компонентов детоксицирующей системы при заражении токсигенным штаммом может быть следствием токсикоза на начальных этапах развития микоза. Кроме того, нами установлено снижение активности процесса инкапсуляции у насекомых, зараженных токсигенным штаммом. Снижение активности инкапсуляции при развитии микозов чаще всего наблюдается при острых инфекциях и на финальных стадиях инфекционного процесса (Gillespie et al., 2000). Отметим, что схожие тенденции были ранее обнаружены нами при анализе активности детоксицирующей системы азиатской саранчи. Через 3 суток после заражения Р-72 наблюдалась экспрессия неспецифических эстераз и ГСТ, а при инфицировании МАК-1 достоверных отличий от контроля не отмечалось (неопубликованные данные Дубовского, Слямовой, Крюкова).

Проведенное нами исследование показывает, что трофическая специализация *M. anisopliae* может проявляться не только в паразитической, но и в некротрофной фазе жизненного цикла, что связано со способностью давать дочернее спороношение на определенных группах хозяев. Вероятно, формирование резко выраженной токсигенной стратегии у *M. anisopliae* может приводить не только к элиминации штаммов, но и сужению круга используемых ими хозяев. Эти явления необходимо учитывать при разработке биопрепаратов для контроля численности насекомых, в особенности, когда речь идет о создании искусственных эпизоотий в их популяциях.

Авторы глубоко признательны Б. А. Борисову (Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН) за ценные замечания, сделанные при ознакомлении с текстом статьи.

Работа выполнена при поддержке фондов Интеграция СО РАН (№ 46), Президента РФ (2372.2011.4) и РФФИ (№ 09-04-00380).

- Борисов Б. А. Проблемы создания и использования микоинсектицидных препаратов // Докл. науч. симпоз. СЭВ «Изучение энтомопатогенных микроорганизмов и разработка технологий производства и применения». Румыния, Бухарест: НИИЗР, 1990. С. 8—22.
- 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. Глупова. М.: Круглый год, 2001. С. 352—427.
- Вейзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. М.: Колос, 1972. 640 с.
- Воронина Э. Г. Энтомофторовые грибы и биопрепараты эпизоотийного и токсического действия // Защита растений. 1997. № 5. С. 12—13.
- Воронина Э. Г., Чумакова А. Я. Ступенчатый отбор вирулентных штаммов *Entomophthora thaxteriana* Petch (Zygomycetes, Entomophthorales) // Микология и фитопатология. 1994. Т. 28, вып. 4. С. 43—47.
- Глупов В. В., Бахвалов С. А., Соколова Ю. А., Слепнева И. А. Механизмы резистентности насекомых // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. В. В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. С. 475—557.
- Крюков В. Ю., Серебров В. В., Малярчук А. А., Копжасаров Б. К., Мухамедиев Н. С., Орынбаева А. К., Ходырев В. П. Перспективы использования энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Nuyphomycetes) против колорадского жука в условиях Юго-Восточного Казахстана // Сиб. вест. с.-х. науки. 2007. № 4. С. 52—60.
- Леднев Г. Р., Левченко М. В. Мюскардиозы итальянского пруса в Новосибирской области // Защита растений от вредителей и болезней / Тр. СПБГАУ. 2004. С. 57—62.
- Литвинов М. А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Л.: Наука, 1969. 115 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.
- Никольская Е. А. Культивирование микроскопических грибов // Методы экспериментальной микологии / Под ред. В. И. Билай. Киев: Наук. думка, 1982. С. 106—138.
- Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др. 1997. Т. 1. М.: Мир, 426 с.
- Павлюшин В. А. Факторы вирулентности гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. и патогенез мускардиоза насекомых: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.: ВИЗР, 1979. 24 с.
- Полтев В. И., Гриценко И. Н., Егорова А. И., Кальвиш Т. К., Туркевич Л. Л., Ушакова Н. В. Микрофлора насекомых. Новосибирск: Наука, 1969. 266 с.
- Серебров В. В., Алексеев А. А., Глупов В. В. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц вошинной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) при микозах // Изв. РАН. Сер. биол. 2001. № 5. С. 588—592.
- Серебров В. В., Гербер О. Н., Малярчук А. А., Мартемьянов В. В., Алексеев А. А., Глупов В. В. Влияние энтомопатогенных грибов на активность детоксицирующих ферментов гусениц пчелиной огневки *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) и роль детоксицирующих ферментов при формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам // Изв. РАН. Сер. биол. 2006. № 6. С. 581—586.
- Яркулов Ф. Я., Белякова Н. А., Леднев Г. Р., Новикова И. И., Павлюшин В. А. Экологические основы биологической защиты овощных культур в теплицах Приморского края. СПб.: Владивосток, 2006. 184 с.
- Bidochka M. J., Kamp A. M., Lavender T. M., Dekoning J., De Croos J. N. A. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species? // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67, N 3. P. 1335—1342.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248—254.
- Charney A. K. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins // Adv. Bot. Res. 2003. Vol. 40. P. 241—321.

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 et al. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 2007. Vol. 4. P. 159—187.

Dubovskiy I. M., Kryukova N. A., Glupov V. V. Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larvae hemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis* // *J. Invertebr. Pathol.* 2008a. Vol. 98, N 3. P. 360—362.

Dubovskiy I. M., Martemyanov B. B., Vorontsova Y. L., Rantala M. J., Gryzanova E. V., Glupov V. V. Effect of the bacterial infection on the antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) // *Comp. Biochem. Physiol.* 2008b. Vol. 148, N 1. P. 1—5.

Fargues J. F., Robert P. H. Effects of passing through scarabeid 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.

Ferron P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium* // Microbial control of pest and plant diseases 1970—1980 / Ed. H. D. Burges. London; New York: Acad. Press, 1981. P. 465—482.

Gillespie J. P., Burnett C., Charnley A. K. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* // *J. Insect Physiol.* 2000. Vol. 46, N 4. P. 429—437.

Kershaw M. J., Moorhouse E. R., Bateman R., Reynolds S. E., Charnley A. K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect // *J. Invertebr. Pathol.* 1999. Vol. 74, N 3. P. 213—223.

Kryukov V. Yu., Khodyrev V. P., Yaroslavtseva O. N., Kamenova A. S., Duisembekov B. A., Glupov V. V. Synergistic action of entomopathogenic hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the infection of colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2009. Vol. 45, N 5. P. 511—516.

Li X., Schuler M. A., Berenbaum M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics // *Annu. Rev. Entomol.* 2007. Vol. 52. P. 231—253.

Pava-Ripoll M., Posada F. J., Momen B., Wang C., St. Leger R. J. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene // *J. Invertebr. Pathol.* 2008. Vol. 99, N 2. P. 220—226.

Roberts D. W., St. Leger R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects // *Adv. Appl. Microbiol.* 2004. Vol. 54. P. 1—70.

Serebrov 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.

St. Leger R. J. *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interactions // *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management* / Eds M. Vurro, J. Gressel. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007. P. 179—204.

St. Leger R. J., Joshi L., Bidochka M. J., Roberts D. W. Construction of an improved mycoinsecticide over-expressing a toxic protease // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. Vol. 93, N 13. P. 6349—6354.

Wang S., Leclercque A., Pava-Ripoll M., Fang W., St. Leger R. J. Comparative genomics using microarrays reveals divergence and loss of virulence-associated genes in host-specific strains of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* // *Eukaryotic Cell*. 2009. Vol. 8, N 6. P. 888—898.

Институт систематики и экологии животных СО РАН

Поступила 4 VII 2010

Новосибирск

krukoff@mail.ru

Всероссийский институт защиты растений

Санкт-Петербург

НИИ защиты и карантина растений

Алма-Ата, Казахстан

## РЕЗЮМЕ

Исследованы два штамма энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae*, различающиеся по своим жизненным стратегиям. Для штамма МАК-1 характерна стратегия роста (относительно длительные микозы и образование обильного спороношения на погибших насекомых из отрядов Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera). Штамм P-72 характеризовался токсигенной стратегией (скоротечный микоз и гибель патогена вместе с хозяевами, в основном на стадии склеротия). Образование дочернего поколения конидий P-72 отмечалось только на некоторых видах Lepidoptera. Исследован ряд культуральных признаков изолятов: динамика роста, продуктивность конидий на искусственных питательных средах и насекомых, активность липаз и протеаз, токсичность для насекомых, взаимодействие с бактериальной микробиотой хозяев. Показано, что при смешанной инфекции (P-72 + МАК-1) происходит конкурентное вытеснение МАК-1 штаммом P-72, но вместе с хозяином гибнут оба патогена. При заражении штаммом P-72 у личинок *Leptinotarsa decemlineata* наблюдалось существенное снижение интенсивности инкапсуляции и повышение уровня неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз, что не отмечено при инфицировании штаммом МАК-1. Обсуждены причины различных стратегий исследуемых штаммов гриба.

Ключевые слова: *Metarhizium anisopliae*, жизненная стратегия, вирулентность, токсичность, жизненный цикл, диапазон хозяев, детоксицирующая система, клеточный иммунитет.

## SUMMARY

Two strains of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with different strategies were investigated. The strain МАК-1 is characterised by the growth strategy (comparatively long mycoses and abundant sporulation at dead insects of Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera orders). The strain P-72 is characterised by the toxin strategy (rapid mycoses and pathogene death together with hosts, mostly on the sclerotium stage). The formation of P-72 conidia was detected only for some Lepidoptera species. The series of cultural features of isolates: a growth dynamics, a conidium productivity in artificial medium and insects, the lipase and protease activity, an insect toxicity, an interaction with host's bacterial microflora were tested. It was shown that there is a competitive replacement of МАК-1 by P-72 strain during a mixed infection (P-72 + МАК-1), but both pathogenes die together with the host. The significant decrease in the encapsulation rate and increase in the activity of non-specific esterases and glutathione S-transferases was observed in the case of *Leptinotarsa decemlineata* larvae infection by P-72 strain and it was not observed in the case of infection by МАК-1 strain. The reasons of different strategies of investigated strains are discussed.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, strategy, virulence, toxicity, life cycle, host range, detoxicant system, cellular immunity.