

## ВИДОВОЙ СОСТАВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ КЫРГЫЗСТАНА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЧИСЛЕННОСТИ НАСЕКОМЫХ-ФИТОФАГОВ

Конурова Д.С.<sup>1</sup>, Леднёв Г.Р.<sup>2</sup>, Левченко М.В.<sup>2</sup>, Успанов А.М.<sup>3</sup>, Тургунбаев К.Т.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, Бишкек, e-mail: konurova.74@mail.ru;

<sup>2</sup>Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, e-mail: georgijled@mail.ru;

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт защиты и карантина растений, Алматы, e-mail: u\_alibek@mail.ru

Среди природных ресурсов регуляции численности вредных видов насекомых, повреждающих сельскохозяйственные и лесные культуры, особого внимания заслуживают энтомопатогенные грибы. Они обитают в почве, на растениях, в телах насекомых. Иногда эти биологические агенты вызывают вспышки массовых заболеваний насекомых, что приводит к резкому подавлению их численности, а это необходимо для сохранения баланса между фитофагами и их кормовыми растениями. Подавление численности вредителя биологическими препаратами, безопасными для окружающей среды, является чрезвычайно актуальной задачей. Поэтому исследования по биоресурсному потенциалу гриба, включающие селекцию природных штаммов, оценку вирулентности гриба и его продуктивности, необходимы для разработки биопрепарата на его основе. Проведенные наблюдения показали, что испытываемые штаммы BCu 113-11, Bm 312-11, BLe48-11 и PCoc410-11 гриба *B. Bassiana* проявляют высокую биологическую активность в отношении личинок колорадского жука первого поколения. На 11-е сутки гибель вредителя существенно увеличилась (до 80%), а на 13-й день после заражения итоговый уровень смертности варьировал в пределах от 28,6 до 100%. При этом смертность в контроле не превышала 2,5%. Гибель в контроле объясняется тем, что, возможно, имели место механические повреждения тел насекомых. А также в контроле на кутикуле личинок пятна не наблюдались, отмечено их активное питание. Максимальный уровень смертности наблюдается только на 7-13-е сутки после заражения, личинки перестают наносить вред гораздо раньше. Меланиновые пятна на теле насекомых появляются на 3-5-е сутки. Исключение составил один штамм (PBr47-11). В этом случае смертность личинок к этому же сроку не превышала 28,6%, а остальные штаммы оказались средневирulentными.

Ключевые слова: изолят, микромицеты, штамм-продуцент, микоинсектициды, микоз, вирулентность, анаморфность.

## SPECIFIC COMPOSITION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI OF KYRGYZSTAN AND THE PROSPECT OF THEIR USE FOR CONTROL OF NUMBER OF INSECTS PHYTOPHAGES

Conurova D.C.<sup>1</sup>, Lednev G.R.<sup>2</sup>, Levchenko M.V.<sup>2</sup>, Uspanov A.M.<sup>3</sup>, Tyrgunbaev K.T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Skryabin, Bishkek, e-mail: konurova.74@mail.ru;

<sup>2</sup>Federal agency for scientific organizations all-russian institute of plant protection (FSBSI VIZR), St. Petersburg, Pushkin, e-mail: georgijled@mail.ru;

<sup>3</sup>Kazakh scientific-research institute for plant protection and quarantine, Almaty, e-mail: u\_alibek@mail.ru

Among natural resources, population control of harmful species of insects that damage agricultural and forest crops, special attention to entomopathogenic fungi. They live in the soil, on plants, in the bodies of insects. Sometimes these biological agents to cause mass outbreaks of diseases and insects, which leads to a drastic suppression of their numbers, and it is necessary to preserve the balance between phytophagous and their host plants. The suppression of the pest population, biological preparations, safe for the environment is a very urgent task. Therefore, studies on bio-resource potential of the fungus, including the selection of natural strains assessment of virulence of the fungus and its productivity, needed for the development of a biological product on its basis. The observations revealed that the test strains BCu 113-11, Bm 312-11, BLe48-11 and PCoc410-11 of the fungus *B. Bassiana* showed high biological activity against larvae of the Colorado potato beetle first-generation. On the 11th day of the death of the pest has increased significantly (80%), and on the 13th day after infection total mortality rates varied in the range of 28.6 to 100%. The mortality in the control did not exceed 2.5%. The loss in control is due to the fact so. it's possible there was mechanical damage to the bodies of insects. And in control on the cuticle of larval spots were observed marked by their active feeding. The maximum level of mortality is observed only in 7 to 13 days after infection, the larvae cease to harm much earlier. Melanin spots on the body of the insect appears 3-5 days. The exception was one strain (PBr47-11). In this case the mortality of larvae of the same date, does not exceed 28.6%, and the remaining strains were medium virulent.

Keywords: isolate, micromicet, producing strain, mycoinsecticides, mycosis, virulence, anamorphous.

Одной из основных задач при разработке биологических препаратов на основе энтомопатогенных грибов является поиск и выделение новых перспективных штаммов-продуцентов. Во многих странах мира (Франция, Германия, Канада, США, Польша), в России и Казахстане сформировались научные направления по изучению энтомопатогенных грибов. Биологические особенности этих патогенов выделяют их в особую группу микроорганизмов, перспективных в качестве естественных регуляторов численности вредных членистоногих в агробиоценозах [9]. К сожалению, до настоящего времени исследования в этом направлении в Кыргызстане не проводились.

**Целью нашей работы** является определение видового состава энтомопатогенных грибов Кыргызстана и оценка вирулентности выделенных культур.

В задачи работы входит:

- сбор и выделение энтомопатогенных грибов в условиях Кыргызстана;
- определение видового состава изолированных культур;
- скрининг выделенных изолятов грибов по признаку вирулентности.

#### **Методы испытаний**

Полевые работы по сбору патологического материала проводились летом 2010-2011 годов (третья декада июля - первая декада августа) в пяти точках предгорной зоны Тянь-Шаня (две на севере республики и пять на юге). К сожалению, поражённые насекомые с признаками микозов были обнаружены только в трех последних из них. При этом подавляющее большинство патологического материала было (около 75%) собрано в государственном природном парке Кара-Шоро (Юго-Западный Тянь-Шань, Ошская область, 1200 м над уровнем моря, 40.2° с.ш., 73.2°). Вероятно, отсутствие сборов в двух других точках было связано с не совсем удачным выбором времени для экспедиции. В результате проведенных работ было собрано более шестидесяти трупов насекомых с признаками микозов.

Анализ собранных образцов и выделенных культур показал, что все обнаруженные на погибших насекомых микромицеты относятся к двум отделам – Entomophthoromycota (=Zygomycota) и Ascomycota.

Среди энтомофторовых грибов было отмечено два вида - *Entomophthora musca* (Cohn) Fresen. на имаго высших мух и *Zoophthora radicans* (Brefeld) Watko на листоблошках. Оба указанных таксона являются типичными космополитами [6].

При этом энтомофтороз на муках в 2010 году в Кара-Шоро носил эпизоотийный характер. На площади около 1 га на листьях и ветвях деревьев вдоль берега горного ручья

наблюдались тысячи поражённых насекомых. Для этого вида гриба такие массовые вспышки заболевания не совсем обычны. И, кроме того, чаще всего проявление микозов данной этиологии наблюдается позднее (конец августа, сентябрь).

Определенный интерес с точки зрения биологического разнообразия представляет выделенный в чистую культуру гриб *Gibellula leiopus* (Vuillemin in Maublanc) Mains. Это анаморфная стадия сумчатого гриба *Torrubiella arachnopila* var. *leiopus* Mains Koval, которая впервые была обнаружена нами на территории Кыргызстана. Данный вид обладает достаточно узкой специфичностью и паразитирует только на пауках.

*G. leiopus* до недавнего времени считался достаточно редким в странах СНГ. По данным Э.З. Коваль (1974), был обнаружен только на острове Кунашир (Россия) [6]. Однако в последние годы появились сообщения о его достаточно широком распространении в Европейской части России и сопредельных государствах [3].

### **Результаты и обсуждение**

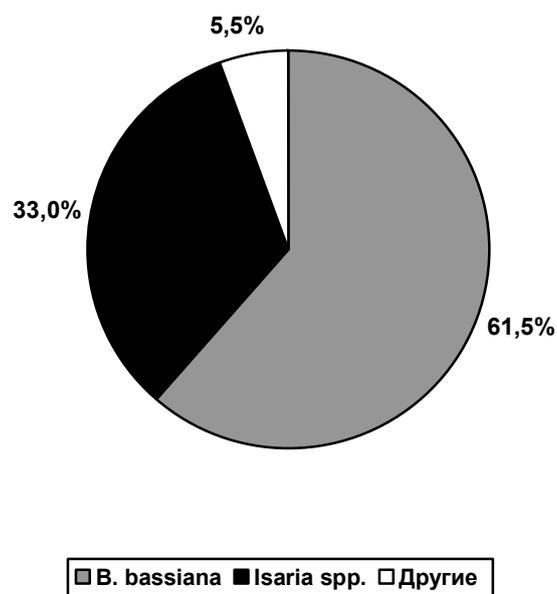
Всего из собранного материала удалось выделить в чистую культуру 57 природных изолятов анаморфных аскомицетов. Первичный анализ видового состава показал, что доминирующим видом является *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. sensu lato. Его доля в структуре видового состава грибов составила 61,5% (рис. 1).

*B. bassiana* является типичным космополитом и встречается повсеместно. Поражает самых разнообразных насекомых практически из всех отрядов, а также клещей. Легко выделяется и хорошо культивируется на искусственных питательных средах различного состава как в поверхностной, так и в глубинной культурах. Около 40% всех существующих грибных биопрепаратов для контроля численности вредных членистоногих создано на основе именно этого вида [12].

На втором месте по встречаемости отмечены представители рода *Isaria* (*Paecilomyces*) (33%). Так же как и предыдущий вид, это типичный космополит с ярко выраженными энтомопатогенными свойствами.

Выявленный видовой состав грибов не совсем обычен. Из литературы известно, что в большинстве районов умеренного пояса Евразии доля *B. bassiana* среди выделяемых культур существенно выше и обычно превышает 80% [10]. При этом удельный вес грибов рода *Isaria* в видовой структуре патогенов значительно меньше.

Среди других изолированных видов с таксономической точки зрения привлекают внимание две культуры грибов из рода *Lecanicillium*, выделенных из имаго высших мух.



*Рис. 1. Соотношение основных групп анаморфных аскомицетов, изолированных из погибших насекомых (2010-2011 гг.)*

Таксономический анализ поражённых микозами насекомых показал следующую картину. Большинство трупов относятся к двум отрядам – жесткокрылые и двукрылые (31,5 и 28,9% соответственно). Далее примерно следуют чешуекрылые и перепончатокрылые (15,8 и 7% соответственно). Опять же в данном случае мы имеем дело с не вполне обычной ситуацией, поскольку чаще всего при сборах в лесной подстилке наиболее поражаемой микозами группой насекомых являются жуки.

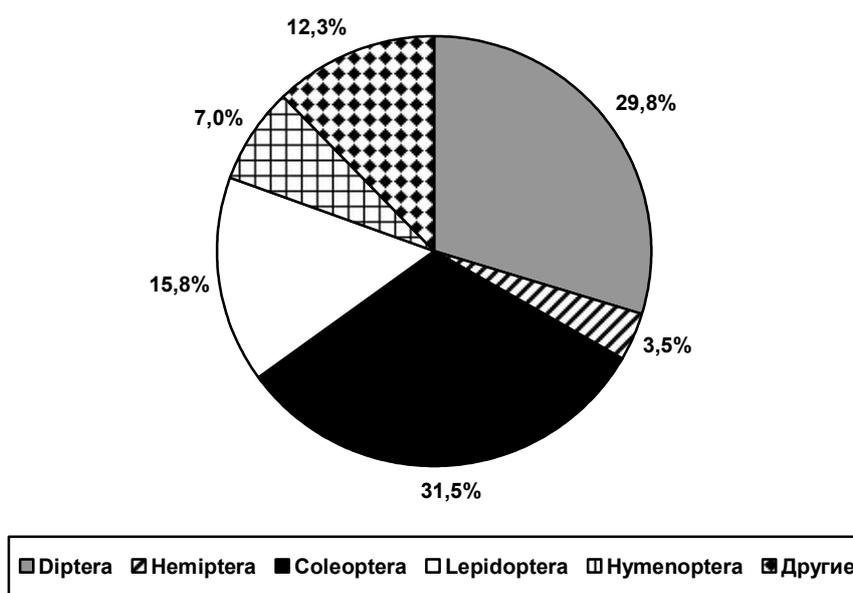


Рис. 2. Групповой состав первичных насекомых-хозяев для выделенных изолятов энтомопатогенных гифомицетов (2006-2008 гг.)

Поскольку в последние два десятилетия в связи с бурным развитием молекулярно-генетических методов в таксономии грибов произошли значительные изменения, для более точной оценки видового состава выделенных грибов было проведено генотипирование отобранных рандомизированно из общей выборки изолированных культур десяти штаммов. Из них семь по морфологическим признакам отнесены к *B. bassiana* sensu lato и три к роду *Isaria*.

Для видовой идентификации штаммов нами был выбран локус ядерной ДНК - межгенный регион Вloc. [11].

Проведенные исследования показали, что все культуры, по морфологическим признакам идентифицированные как *B. bassiana*, относятся к одному гаплотипу криптического вида *B. pseudobassiana* Rehner & Humber (табл. 1). Здесь следует подчеркнуть, что в настоящее время классический вид *B. bassiana* по молекулярно-генетическим показателям был разделен на пять морфологически идентичных таксонов видового уровня [11].

Род *Isaria* представлен также только одним видом *I. farinosa*.

Таблица 1

Каталог молекулярных гаплотипов Вloc, характеризующих штаммы грибов родов *Beauveria* и *Isaria*, выявленных в настоящей работе в сравнении с записями, доступными в Генбанке

Показатель	Вид	
	<i>Beauveria pseudobassiana</i>	<i>Isaria farinosa</i>
Типовой штамм в Генбанке	ARSEF 1852	ARSEF 4029
Номер доступа в Генбанке	KM031781	HQ881019
Эталонный штамм рабочей выборки	BCo28-11	PD23-10
Уровень сходства с типовым штаммом из Генбанка, %	100	100

На следующем этапе исследований в лабораторных условиях была проведена первичная оценка биологической активности тридцати одного, отобранного рандомизированно, штамма грибов на личинках старших возрастов колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say).

Насекомых заражали водной суспензией конидий с титром  $1 \times 10^7$  спор/мл.

Проведённые наблюдения показали, что смертность тест-насекомых практически во всех вариантах опыта была существенно выше по сравнению с контролем (табл. 2). При этом была выявлена значительная вариабельность штаммов по данному показателю. Итоговый уровень смертности (13-е сутки после заражения) варьировал в пределах от 28,6 до 100%. При этом существенно преобладали средневирulentные формы (уровень смертности 60-90%), доля которых превышала 51% (рис. 3). Удельный вес высоковирулентных штаммов составил 25,8%. При этом в данной группе культур лучшими по скорости гибели личинок вредителя были семь штаммов (BCd45-10, BCoc 43-11, BCu113-11, BLe48-11, BBr18-11, BBr35-11, PCoc410-11). Для них уже через неделю после инокуляции уровень смертности варьировал в пределах от 92,5 до 100%.

Таблица 2

Биологическая активность штаммов анаморфных аскомицетов в отношении личинок старших возрастов колорадского жука

Штамм	Смертность, % (сутки)					
	3	5	7	9	11	13
<b><i>B. bassiana sensu lato</i></b>						
BCd45-10	0,0±0,0	45,1±7,5	69,6±3,3	81,8±7,2	81,8±7,2	100
BE112-11	0,0±0,0	0,0±0,0	60,6±8,3	69,4±6,8	74,8±2,4	85,1±6,1
BE116-11	0,0±0,0	3,1±3,1	28,5±13,9	62,2±14,1	62,2±14,1	70,8±11,4
BCoc49-11	4,6±2,7	9,1±0,3	31,8±5,6	47,7±3,9	47,7±3,9	55,0±7,5
BCoc43-11	21,7±15,7	43,5±9,9	61,0±14,6	95,0±5,0	100	100
BCoc111-11	7,6±2,9	9,7±3,7	56,9±14,6	60,8±15,5	66,4±12,7	68,4±13,4
BCo110-11	7,5±0,6	32,0±2,6	66,6±8,1	68,3±8,6	73,0±4,4	73,0±4,4
BCo115-11	0,0±0,0	36,0±5,2	52,3±3,8	58,8±8,1	58,8±8,1	60,2±7,7
BCo315-11	0,0±0,0	60,6±6,1	82,1±6,9	82,1±6,9	82,1±6,9	82,1±6,9
BCu113-11	12,8±2,4	42,8±11,6	92,5±4,8	97,5±2,5	100	100
BFo39-10	33,0±6,3	41,5±3,5	73,9±11,5	77,5±13,1	82,5±11,8	87,5±12,5
BLe48-11	0,0±0,0	53,3±7,8	100	100	100	100
BLe44-11	13,6±4,7	49,6±9,8	63,8±3,2	65,6±2,4	65,6±2,4	69,0±1,4
BLe13-	8,3±8,3	20,8±12,5	30,5±11,3	51,1±7,6	55,3±10,9	59,2±8,4

11						
Bm312-11	9,5±5,5	75,3±7,3	94,9±2,9	97,7±2,3	97,7±2,3	97,7±2,3
Bm38-11	24,8±14,9	32,5±13,9	44,1±15,5	58,7±12,4	58,7±12,4	64,2±13,3
BBr44-10	0,0±0,0	11,1±4,5	41,3±8,7	85,4±9,2	85,4±9,2	85,4±9,2
BBr33-11	31,9±14,8	48,0±12,4	54,4±9,0	79,6±8,8	79,6±8,8	87,3±7,4
BBr17-11	22,1±7,8	29,6±12,5	48,8±10,5	53,3±7,8	57,6±8,6	63,2±10,5
BBr18-11	0,0±0,0	7,1±4,1	66,5±13,2	79,5±9,0	96,4±3,6	100
BBr35-11	27,6±6,5	41,9±9,2	50,5±8,6	64,8±16,5	73,1±13,0	100
<b><i>Isaria spp.</i></b>						
PBr47-10	10,0±4,1	17,5±4,8	35,0±8,7	47,5±10,3	47,5±10,3	50,0±9,1
PBr47-11	7,0±4,4	7,0±4,4	16,6±4,3	23,6±2,1	23,6±2,1	28,6±4,2
PD24-11	5,1±2,9	9,8±3,7	19,6±6,3	32,8±10,7	32,8±10,7	40,8±13,7
PCoc410-11	2,5±2,5	35,0±9,6	92,5±4,8	95,0±2,9	97,5±2,5	100
PLe27-11	0,0±0,0	6,7±3,9	27,2±6,2	63,4±10,6	70,5±11,6	77,2±14,9
PLe314-11	7,5±4,8	7,5±4,8	13,1±5,1	15,8±3,1	18,6±5,4	31,4±3,7
Pm112-11	2,5±2,5	5,0±5,0	27,8±6,0	46,1±2,4	46,1±2,4	53,9±2,4
Pm118-11	2,5±2,5	15,6±6,6	55,3±6,1	71,1±12,5	73,9±12,5	81,7±8,5
PHy31-11	0,0±0,0	0,0±0,0	38,0±14,8	62,5±17,5	62,5±17,5	75,0±9,6
PHy19-11	15,1±6,7	31,0±10,9	51,5±9,5	58,5±6,4	60,6±4,7	63,1±6,6
Контроль	0,0±0,0	5,6±5,6	10,6±6,1	13,3±8,2	13,3±8,2	19,6±7,1
HCP <sub>05</sub>	18,78	22,66	26,58	25,63	23,12	21,19

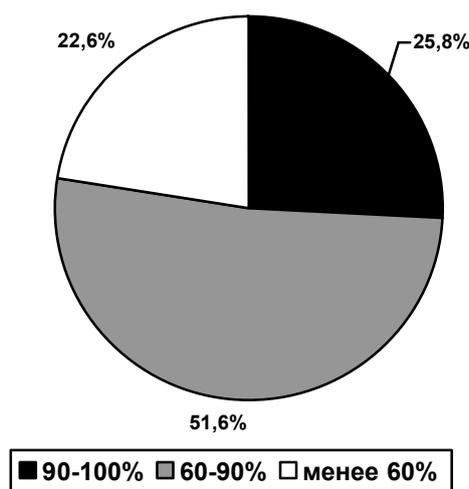


Рис. 3. Соотношение культур анаморфных аскомицетов по признаку вирулентности на личинках колорадского жука

## Выводы

Здесь особо следует отметить, что большинство энтомопатогенных анаморфных аскомицетов являются не специализированными видами. Поэтому с большой долей вероятности можно говорить о том, что если конкретный штамм проявляет высокую биологическую активность на одном виде вредителя, то он будет высоковирулентным и к другим видам фитофагов [8].

Сравнительный анализ данных по вирулентности *B. bassiana* sensu lato и грибов рода *Isaria* показал, что штаммы первой группы обладают более высокой биологической активностью в сравнении со второй. Так, если в первом случае доля высоковирулентных форм составила 33,3%, то во втором она не превышала 10%.

Таким образом, в качестве перспективных штаммов-продуцентов новых микроинсектицидов для контроля численности колорадского жука можно рекомендовать четыре штамма: BCu113-11, Bm312-11, BLe48-11 и PCoc410-11.

### Список литературы

1. Андросов Г.К. Энтомофильные грибы таежных биогеоценозов. - СПб., 1992. – 158 с.
2. Борисов Б.А. Проблемы создания и использования микроинсектицидных препаратов // Изучение энтомопатогенных микроорганизмов и разработка технологий производства и применения // Научн. раб. симп. СЭВ. – 1990. – С. 8-23.
3. Борисов Б.А., Жирков В.М., Глупов В.В. и др. Роль Лазовского заповедника в сохранении биоразнообразия грибов сем. Clavicipitaceae - потенциальных продуцентов биопестицидов и фармацевтических препаратов // Труды Лазовского государственного природного заповедника им. Л.Г. Карпинского. – 2005. - Вып. 3. – С. 27-57.
4. Каменова А.С. Видовой состав энтомопатогенных грибов в предгорьях Заилийского Алатау // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. - Астана, 2009. – С. 74-81.
5. Каменова А.С., Леднев Г.Р. Энтомопатогенные грибы юго-востока Казахстана и перспективы использования их против насекомых-фитофагов // Вестник Павлодарского государственного университета им. С. Торайгырова. - Павлодар, 2009. – С. 119-124.
6. Коваль Э.З. Определитель энтомофильных грибов СССР. – Киев : Наукова Думка, 1974. – 260 с.
7. Крюков В.Ю., Леднев Г.Р., Дубовский И.М., Серебров В.В., Левченко М.В., Ходырев В.П., Сагитов А.О., Глупов В.В. Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Nyphomycetes) для регуляции численности насекомых // Евроазиатский энтомологический журнал. - 2007. - Т. 6. - № 2. - С. 195-204.

8. Крюков В.Ю., Ярославцева О.Н., Левченко М.В., Леднев Г.Р. Вирулентность штаммов *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisopliae* по отношению к насекомым различных отрядов // Материалы V Всероссийского съезда паразитологического общества при Российской академии наук «Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения». – 2008. – Т. 2. – С. 97-98.
9. Леднев Г.Р., Крюков В.Ю., Левченко М.В., Успанов А.М., Сагитов А.О., Глупов В.В., Павлюш В.А. Подходы к созданию новых микоинсектицидов и разработке стратегии их применения в защите растений для аридных зон // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. - 2011. - № 43. - С. 132-136.
10. Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р. Энтомопатогенные грибы Восточной Сибири. – Иркутск, 2000. - 134 с.
11. Cai Y., Pu Sh., Nie Y., Rehner St. A., Huang B. Discrimination of Chinese *Beauveria* strains by DGGE genotyping and taxonomic identification by sequence analysis of the Bloc nuclear intergenic region // *Appl. Entomol. Zool.* – 2013. - 48: 255–263.
12. Faria M.R., Wraight S.P., Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types // *Biol. Control.* – 2007. - 43: 237-256.