УДК 632.937.14

Н. Л. Севницкая
Институт леса Национальной Академии Наук Беларуси

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛЯТОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL., ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ КОРОЕДА ТИПОГРАФА

Проведен анализ биологических особенностей наиболее вирулентных изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (5-07, 6-07, 13-07, 14-08, 20-08), выделенных в очагах массового размножения стволовых вредителей на территории Беларуси. Описаны морфология колоний изолятов, продуктивность и жизнеспособность культур изолятов на четырех питательных средах: Чапека-Докса, Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых, Сабуро, картофельно-глюкозный агар. На данных средах у изолятов выявлено шесть типов морфологически различающихся по характеру развития колоний. Изоляты 5-07, 6-07, 13-07, 14-08, 20-08 формируют колонии I, II, IV; I, V; III, VI; I, II; III, IV типов, соответственно. Обнаруженные различия морфолого-культуральных признаков изолятов *Beauveria bassiana* характеризуют гетерогенность природной популяции гриба. Наиболее оптимальными средами для культивирования изолятов (5-07, 6-07, 13-07, 20-08) являются среда Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых и Сабуро. В результате анализа биологических и морфологических особенностей наиболее вирулентных изолятов гриба *Beauveria bassiana* изоляты 13-07 и 20-08 больше всего подходят для наработки биопрепаратов на их основе для снижения численности короеда типографа.

Ключевые слова: биологический метод защиты леса, изоляты, энтомопатогенный гриб *Beauveria bassiana*, колонии, питательные среды, продуктивность, жизнеспособность культур изолятов.

N. L. Sevnitskaya
Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus

BIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF ISOLATES OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL., PERSPECTIVE FOR DECREASE OF SIZE OF THE SPRUCE BARK BEETLE *IPS TYPOGRAPHUS* L.

The analysis of biological features of the most virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (5-07, 6-07, 13-07, 14-08, 20-08) is carried out. They were chosen in the centers of mass reproduction of the trunk pests in the territory of Belarus. The morphology of the colonies of isolates, the average diameter of the colonies, the average daily growth rate, the growth coefficient, productivity and vitality of the cultures of isolates on four nutrient mediums (Czapek-Dox medium, Czapek-Dox medium supplemented with insect broth, Sabouraud medium and potato glucose agar) are described. On these mediums at isolates six types of the colonies are revealed which are morphologically differing on nature of development. Isolates 5-07, 6-07, 13-07, 14-08, 20-08 form colonies of I, II, IV; I, V; III, VI; I, II; III, IV types, accordingly. The found distinctions of morfologo-cultural signs of the *Beauveria bassiana* isolates characterize heterogeneity of natural population of the mushroom. Optimal media for cultivation of the mushroom isolates (5-07, 6-07, 13-07, 20-08) are Czapek-Dox medium supplemented with insect broth and Sabouraud medium. As a result of the analysis of biological and morphological features of the most virulent isolates of fungus *Beauveria bassiana* isolates 13-07 and 20-08 most of all are suitable for production of biopreparations on their basis for decrease of size of the spruce bark beetle *Ips typographus* L.

Key words: biological method of protection of the wood, isolates, entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, colonies, nutrient mediums, productivity, vitality of cultures of isolates.

Введение. В настоящее время большую проблему представляет массовое усыхание еловых насаждений, вызванное деятельностью короеда типографа. В качестве дополнительных мер борьбы приобретает актуальность разработка микробиологических приемов снижения численности жуков на основе энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*. Изучение биологических и морфологических особенностей новых изолятов гриба необходимо для создания перспективных биопрепаратов для борьбы с короедом типографом.

Основная часть. Из 20 изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*, выделенных раннее мной и Малым Л. П. из окружающей среды, 5 изолятов (5-07, 6-07, 13-07, 14-08, 20-08) оказались наиболее вирулентными против жуков короеда типографа [1]. Данные изоляты

зарегистрированы в Генном банке (Gen Bank NCBI). Чистые культуры изолятов хранятся в пробирках на косом агаре на среде Чапека-Докса в лабораторных условиях и периодически пересеваются. Для более полного исследования данных изолятов изучали их биологические и морфологические особенности на четырех питательных средах: Чапека-Докса, Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых, Сабуро, картофельно-глюкозный агар. Морфология колоний изолятов на среде Чапека-Докса была описана в предыдущей работе [1]. В настоящее время исследования изолятов на данной среде проводились для изучения генетической стабильности культур при хранении на искусственной питательной среде. При характеристике колоний грибов учитывали характер строения колоний: форма колонии, края, центра, поверхности, структура, окраска колоний и реверзума (обратная сторона колонии). В качестве руководства использовали работу Огаркова Б. Н. [2]. Грибы выращивали в чашках Петри путем точечного нанесения спор на агаровую пластинку в центр чашки в четырехкратной повторности и в пробирках на косом агаре в пятикратной повторности при t = 24°С. Колонии описывали на 28-е сутки культивирования. Исследовали продуктивность и жизнеспособность изолятов при культивировании на четырех вышеперечисленных средах в пробирках на косом агаре на 31-е сутки опыта.

На основе изучения морфологии колоний изолятов на питательных средах выявлено шесть основных типов: I – возвышенные колонии с пушисто-ватообразным воздушным мицелием и концентрической зональностью, II – возвышенные колонии с рыхлым паутинистым мицелием, III – плоские колонии с ровной поверхностью мучнистого типа, IV – переходный тип, который сочетает в себе морфологические признаки первого и третьего типов колоний, V – плоские колонии с ровной поверхностью бархатистого типа, VI – возвышенные колонии мучнистого типа. Приводим описание морфологических особенностей наиболее вирулентных изолятов гриба *Beauveria bassiana* по шести типам.

Изолят 5-07 на данных средах образует три типа колоний (I, II, IV). На средах Чапека-Докса и Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых изолят формирует колонии IV типа. На среде Чапека-Докса колонии круглые, плоские, войлочно-мучнистые, желтовато-белого цвета, реверзум бледножелтый. Колонии состоят из двух концентрических зон. Спороношение обильное, консистенции растертого мела. Край колонии неровный, центр куполообразный. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $2{,}1 \cdot 10^9$ спор/мл; 91,3%.

Колонии круглые, плоские, мучнистые, желтовато-белого цвета, реверзум малиновый на среде Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых. Колонии состоят из двух концентрических зон. Спороношение обильное, консистенции растертого мела. Край колонии ровный, центр куполообразный. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $6{,}6 \cdot 10^9$ спор/мл; 96,4%.

На среде Сабуро колонии круглые, возвышенные, пушистые, желтовато-белого цвета, реверзум желтовато-бурый (II тип). Колонии высоко подняты над субстратом, образуют коремии. Спороношение обильное, консистенции муки с войлоком. Край колонии ровный, центр не выражен. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $6{,}6 \cdot 10^9$ спор/мл; 15,2%.

Изолят 5-07 формирует колонии I типа на картофельно-глюкозном агаре. Колонии круглые, возвышенные, пушистые, белого цвета, реверзум темнокремовый. Колонии состоят из пяти концентрических зон. Спороношение необильное, консистенции муки с войлоком. При прикосновении микробиологической петлей мицелий отрывается с трудом, берется только слой конидий, сминая мицелий. Край колонии ровный, центр приподнятый. Присутствуют капли экссудата. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $1{,}1 \cdot 10^9$ спор/мл; 91,3%.

Изолят 6-07 на исследуемых средах образует два типа колоний (I, V). На среде Чапека-Докса, Сабуро и картофельно-глюкозном агаре колонии круглые, возвышенные, пушистые, желтовато-белого цвета (I тип). Колонии приподняты над субстратом и состоят из двух концентрических зон, вторая зона только на среде Чапека-Докса образует коремии. Спороношение обильное, консистенции муки с войлоком. Край колонии ровный. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $1{,}8 \cdot 10^9$ спор/мл; 89,3%; реверзум бледно-лимонный, центр колонии нечетко выражен, приподнятый на первой среде; те же показатели – $4{,}8 \cdot 10^9$ спор/мл; 93,7%; центральная часть реверзума рыжеватая, периферическая часть абрикосово-желтая; центр колонии не выражен на второй среде; те же показатели – $3{,}7 \cdot 10^9$ спор/мл; 94,9%; реверзум темно-кремовый; центр в виде небольшого бугорка на третьей среде.

На среде Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых колонии круглые, плоские, бархатистые желтовато-белого цвета, реверзум желто-охряный (V тип). Колонии слегка приподняты над субстратом. Спороношение обильное, консистенции муки с войлоком. Край колонии диффузный, центр колонии приподнятый, в виде бугорка. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $4{,}9 \cdot 10^9$ спор/мл; 91,7%.

Изолят 13-07 на среде Чапека-Докса, Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых, картофельно-глюкозном агаре образует колонии III типа. На данных средах колонии круглые, плоские, мучнистые, желтовато-белого цвета, реверзум желтоватый. Колонии плотно прилегают к субстрату. Спороношение обильное, консистенции растертого мела. Споры легко берутся микробиологической петлей, рассыпаясь при прикосновении. Край колонии диффузный, центр приподнятый, в виде пуговки. Присутствуют капли экссудата. Продуктивность и жизнеспособность изолята на среде Чапека-Докса – $5{,}2 \cdot 10^9$ спор/мл; 91,9%; на среде Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых – $7{,}2 \cdot 10^9$ спор/мл; 92,9%; на картофельно-глюкозном агаре – $2{,}8 \cdot 10^9$ спор/мл; 95,8%.

На среде Сабуро изолят 13-07 формирует колонии VI типа. Колонии круглые, возвышенные, мучнистые, кремового цвета, реверзум канареечно-желтый. Колонии приподняты над субстратом. Спороношение обильное, консистенции растертого мела. Край колонии ровный, центр приподнятый, в виде пуговки. Присутствуют капли экссудата. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $7{,}9 \cdot 10^9$ спор/мл; 9,9%.

Изолят 14-08 на вышеперечисленных средах образует два типа колоний (I, II). На среде Чапека-Докса колонии круглые, возвышенные, пушистые, бледножелтого цвета, реверзум желто-оранжевый (I тип). Колонии высоко подняты над субстратом и состоят из трех концентрических зон. Спороношение необильное, консистенции муки крупного помола с войлоком. Край колонии ровный, центр куполообразный. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $0{,}5 \cdot 10^9$ спор/мл; 89,3%.

На среде Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых, Сабуро и картофельно-глюкозном агаре изолят 14-08 формирует колонии II типа. На среде Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых колонии круглые, возвышенные, пушистые, желтовато-белого цвета, реверзум бледножелтый. Колонии слегка приподняты над субстратом. Спороношение обильное, консистенции муки с войлоком. Край колонии ровный, центр не выражен. Присутствуют капли экссудата. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $1{,}8 \cdot 10^9$ спор/мл; 84,5%.

Колонии круглые, возвышенные, пушистые, желтовато-белые, реверзум шафраново-желтый на среде Сабуро. Колонии приподняты над субстратом. Спороношение необильное, консистенции муки с войлоком. Край колонии ровный, центр куполообразный. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $0{,}4 \cdot 10^9$ спор/мл; 46,2%.

На картофельно-глюкозном агаре колонии круглые, возвышенные, пушистые, желтовато-белые, реверзум бледножелтый. Колонии слегка приподняты над субстратом. Спороношение необильное, консистенции муки крупного помола с войлоком. Край колонии диффузный, центр не выражен. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $0{,}5 \cdot 10^9$ спор/мл; 90,0%.

Изолят 20-08 на исследуемых средах формирует два типа колоний (III, IV). На среде Чапека-Докса колонии круглые, плоские, войлочно-мучнистые, желтовато-белого цвета, реверзум бледножелтый (IV тип). Колонии слегка приподняты над субстратом и состоят из трех концентрических зон. Спороношение обильное, консистенции муки с войлоком. Край колонии неровный, лучистый, центр выпуклый. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $2{,}1 \cdot 10^9$ спор/мл; 85,4%.

На средах Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых и Сабуро колонии круглые, плоские, мучнистые, желтовато-белого цвета, реверзум желтоватый (III тип). Колонии плотно прилегают к субстрату. Спороношение обильное, консистенции растертого мела. Край колонии ровный. В центре колонии наблюдается морщинистость. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $2{,}9 \cdot 10^9$ спор/мл; 69,3%; центр колонии углубленный на первой среде; те же показатели – $7{,}0 \cdot 10^9$ спор/мл; 91,9%; центр в виде пуговки на второй среде.

На картофельно-глюкозном агаре колонии круглые, плоские, мучнистые, белые с бледнорозовым оттенком, реверзум центральной части коричневый, в месте посева черный (III тип). Колонии плотно прилегают к субстрату. Спороношение обильное, консистенции растертого мела. Край колонии ровный, центр в виде небольшого бугорка. В центральной части колонии наблюдается морщинистость. Продуктивность и жизнеспособность изолята – $3{,}6 \cdot 10^9$ спор/мл; 95,3%.

Таким образом, изоляты на разных средах образуют колонии как разных, так и одинаковых типов. Отмеченные выше шесть разновидностей колоний изолятов не всегда имеют строгую структуру, которая присуща одному варианту, у части из них (IV тип колоний) наблюдаются смешанные признаки. Изолят 5-07 на среде Чапека-Докса в предыдущих исследованиях [1] формировал колонии I типа, в последней работе – IV типа. Это можно объяснить тем, что изолят оказался генетически неустойчивым и при рассеве образует две морфологические формы. Изоляты 6-07 и 14-08 образуют один тип колоний, что и раньше, однако у изолята 6-07 имеются морфологические отличия в строении колоний. Выявлены значительные колебания продуктивности изолятов на этой же среде при сравнении результатов двух исследований, что подтверждает генетическую неста-

бильность изолятов. Изоляты 13-07, 20-08 оказались более стабильными, чем остальные, и на среде Чапека-Докса формировали колонии тех же типов, имеющие одинаковую морфологию, что и в предыдущих исследованиях.

При изучении биологических и морфолого-культуральных особенностей изолятов установлено, что все они по-разному растут на исследуемых питательных средах, имеют разные значения жизнеспособности, продуктивности. Так, жизнеспособность изолятов на четырех питательных средах высокая (от 69,3% до 96,4%) кроме среды Сабуро, на которой у изолятов 5-07, 13-07 и 14-08 низкие показатели жизнеспособности (15,2%; 9,9% и 46,2%). Можно отметить, что наиболее высокие показатели продуктивности установлены на среде Чапека-Докса у изолята 13-07; на среде Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых и Сабуро – у изолятов 5-07, 6-07, 13-07, 20-08; на картофельно-глюкозном агаре – у изолятов 6-07, 13-07, 20-08. Самые низкие значения продуктивности оказались на среде Чапека-Докса, Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых, Сабуро у изолята 14-08; на картофельно-глюкозном агаре – у изолятов 5-07, 14-08.

Заключение. Все исследуемые изоляты различаются по морфолого-культуральным признакам, что можно объяснить их биологическими особенностями, которые характеризуют гетерогенность и фенотипическое разнообразие природной популяции гриба *Beauveria bassiana*. На четырех исследуемых питательных средах установлено шесть типов морфологически различающихся колоний. Наиболее оптимальными средами для культивирования изолятов (5-07, 6-07, 13-07, 20-08) являются среда Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых и Сабуро. Изоляты 13-07 и 20-08 больше всего подходят для наработки биопрепаратов для снижения численности короеда типографа, так как формируют колонии III типа (плоские, мучнистые, обильно спороносящие) и обладают высокой продуктивностью.

Литература

1. Севницкая Н. Л., Малый Л. П. Биологические и морфологические особенности изолятов *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., перспективных в борьбе с короедом типографом // Труды Института леса. Вып. 69: Проблемы лесоведения и лесоводства. 2009. С. 716–726.

2. Огарков Б. Н., Огаркова Г. Р., Голубых Е. Т. Морфологические особенности энтомопатогенных грибов рода *Beauveria* Vuill., *Paecilomyces* Brown et Smith. // Энтомопатогенные микроорганизмы и их применение в сельском и лесном хозяйстве: сб. научн. тр. 1982. С. 117–128.

References

1. Sevnitskaya N. L., Malyy L. P. Biological and morphological features of isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., perspective in the struggle with the spruce bark beetle (*Ips typographus* L.). *Trudy instituta lesa* [Proceedings of Forest Institute]. 2009, issue 69: Problems of silvics and forestry, pp. 716–726 (in Russian).

2. Ogarkov B. N., Ogarkova G. R., Golubykh E. T. Morphological features of the entomopathogenic fungus *Beauveria* Vuill., *Paecilomyces* Brown et Smith. *Entomopatogennye mikroorganizmy i ikh primenenie v sel'skom i lesnom khozyaystve* [*Entomopathogenic microorganisms and their application in agriculture and forestry*]. 1982, pp. 117–128 (In Russian).

Информация об авторах

Севницкая Наталья Леонидовна – научный сотрудник лаборатории проблем восстановления, защиты и охраны лесов. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: n.sevnickaja@tut.by

Information about the authors

Sevnitskaya Natalia Leonidovna – research fellow, Laboratory of problems of restoration, protection and conservation of forests. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: n.sevnickaja@tut.by

Поступила 18.02.2015