

УДК 632.937.14

Н. Л. Севницкая

Институт леса Национальной академии наук Беларуси

**ПРОДУКТИВНОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА
BEAUVERIA BASSIANA (BALS.) VUILL. ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ**

Проведен анализ биологических особенностей наиболее вирулентных изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (5-07, 13-07, 20-08), выделенных в очагах массового размножения стволовых вредителей на территории Беларуси. На их основе разработаны препараты на четырех зерновых субстратах: ячмень, пшено, перловая крупа, пшеница. Описаны продуктивность, жизнеспособность и биологическая активность культур изолятов на данных питательных средах. В качестве эталона применяли биопрепараты «Боверин зерновой-БЛ», «Melobass, ps.». Продуктивность на ячмене у всех изолятов была выше в 1,1–5 раз, жизнеспособность спор у изолятов 5-07 и 13-07 оказалась выше на ячмене и пшенице, у изолята 20-08 – на тех же средах и пшенице, чем на эталоне («Боверин зерновой-БЛ»). Наибольшая биологическая активность выявлена у изолятов на ячмене по сравнению с эталоном. Наиболее оптимальными средами для разработки биопрепаратов являются ячмень для изолятов 5-07, 13-07, 20-08; пшено для изолята 20-08 и пшеница для изолята 13-07, так как на данных средах изоляты проявили наибольшую биологическую активность, жизнеспособность спор и продуктивность по сравнению с остальными средами.

Ключевые слова: изоляты, энтомопатогенный гриб *Beauveria bassiana*, питательные среды, биологическая активность, продуктивность, жизнеспособность культур изолятов.

N. L. Sevnitskaya

Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus

**PRODUCTIVITY AND VIRULENCE OF THE ENTOMOPATHOGENIC
FUNGUS *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. AT CULTIVATION
ON DIFFERENT NUTRIENT MEDIUMS**

The analysis of biological features of the most virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (5-07, 13-07, 20-08) is carried out. They were chosen in the centers of mass reproduction of the trunk pests in the territory of Belarus. The preparations are produced on the four corn substratum: barley, millet, pearl-barley, wheat on the basis of these isolates. Productivity, vitality and biological activity of the cultures of isolates on these nutrient mediums are described. We used as standard biological preparations “Boverin corn-BI”, “Melobass, ps”. Productivity was to 1,1–5 times higher on barley at all isolates, vitality spores was higher on barley and wheat at isolates 5-07 and 13-07, on the same mediums and millet at isolate 20-08, than on a standard (“Boverin corn-BI”). The greatest biological activity is revealed at isolates on barley in comparison with a standard. Optimal media for production of the biological preparations are barley for isolates 5-07, 13-07, 20-08; millet for isolate 20-08 and wheat for isolate 13-07. The spores of the isolates cultivated on these media exhibit high biological activity, vitality and productivity in comparison with other media.

Key words: isolates, entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, nutrient mediums, biological activity, productivity, vitality of cultures of isolates.

Введение. Лесное хозяйство Беларуси несет ежегодно ощутимый ущерб от повреждения еловых насаждений короедом типографом и другими стволовыми вредителями. В качестве дополнительных мер борьбы против энтомопатогенных грибов (*Beauveria bassiana*), не оказывающих негативного влияния на полезные компоненты лесного биоценоза. Как правило, энтомопатогенные грибы патогенны для насекомых-вредителей, способны к росту на

искусственных питательных средах, экологически безопасны, поэтому могут служить основой для создания биологических препаратов для защиты растений от вредных насекомых и вноситься в лесные биоценозы.

Исследование энтомопатогенных грибов, а также их практическое использование постоянно связаны с проблемой их массового размножения. В настоящее время разработаны технологии производства препаратов в нескольких препаративных формах: зерновой влажной, жидкой, сухой. Подбор оптимальной питатель-

ной среды и способов и условий культивирования имеет существенное значение в создании микоинсектицидных препаратов. Твердофазный способ более пригоден для производства грибных препаратов, так как хорошее спороношение грибов можно получить на зерновых и агаризованных средах за счет увеличения спороносящей поверхности. При поверхностном способе культивирования грибов используют твердые субстраты (пшеница, ячмень, кукуруза и др.). Король И. Т., Буланов П. А., Безденко Т. Т. разработали способ получения препарата «Боверин» из гриба *Beauveria bassiana* на отходах ячменя от производства трихограммы – мелкого паразитического насекомого – яйцееда, производство которого налажено в республике, и на картофельном отваре [1]. Трихограмма поражает яйца зерновой моли, которая питается ячменем. Приготовленная среда хорошо аэрируется, кроме того, трупы бабочек, личиночные шкурки и экзувий зерновой моли обогащают ее хитином насекомых, помогающим поддерживать вирулентность гриба.

Так, Микульская Н. И., Герасимович М. С. определили, что наилучшим вариантом питательной среды, обеспечивающим ростовую активность штамма энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (шт. 1-01), являются отходы ячменя от производства трихограммы, NH_4NO_3 (3 г на 1 кг отходов ячменя), хитин (трупы бабочек зерновой моли 50–100 г на 1 кг отходов ячменя). При этом добавление NaNO_3 и NH_4NO_3 из расчета 3 г на 1 кг среды увеличивает выход биомассы гриба *Beauveria bassiana* (шт. 1-01) в 3,3–3,4 раза. Титр штамма оказался стабильным и составил $3,1 \cdot 10^9$ спор/г [2].

Левченко М. В. изучал продуктивность энтомопатогенных гифомицетов *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* на пшене, рисе, перловой крупе, горохе [3]. Состав питательной среды, способ и условия культивирования влияют на вирулентность, продуктивность, начало спорообразования, выход биомассы и другие свойства грибов. Изучение биологических особенностей изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* при культивировании на разных питательных средах является актуальным для подбора оптимальной среды для наработки биопрепарата.

Основная часть. В предыдущей работе нами предлагается среду Чапека-Докса с добавлением отвара из насекомых, Сабуро и картофельно-глюкозный агар использовать для выращивания маточной культуры изолятов [4]. В полевых исследованиях сами биопрепараты планируется применять в виде зерновых субстратов, которые помещают в модифициро-

ванные феромонные ловушки, а также при приготовлении рабочих растворов для опрыскивания ловчей и заготовленной древесины. Проводили подбор оптимальной питательной среды для твердофазного культивирования трех изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* 5-07, 13-07, 20-08 при создании биопрепаратов. Данные изоляты выделены ранее из окружающей среды и оказались наиболее вирулентными против жуков короеда типографа. ЛК_{50} данных изолятов было наименьшей по сравнению с ЛК_{50} остальных изолятов на 14-е сутки опыта и составила $12,54 \cdot 10^6$; $21,3 \cdot 10^6$; $13,81 \cdot 10^6$ спор/мл, соответственно. В лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси произведено секвенирование ITS1-5,8sRNA-ITS2 региона Рибосомальной ДНК вышеперечисленных трех изолятов. На основании полученных данных о нуклеотидной последовательности составлены генетические паспорта. Изоляты зарегистрированы в Генном банке (Gen Bank NCBI) и им присвоены следующие идентификационные номера: FJ 882030 (5-07), FJ 888527 (13-07), FJ 868831 (20-08). Проводили сравнительное изучение продуктивности, жизнеспособности и биологической активности изолятов в поверхностной культуре на четырех видах сыпучих субстратов: ячмене, пшене, перловой крупе и пшенице. В качестве эталона использовали два биопрепарата «Боверин зерновой-БЛ» и «Melobass, пс.», наработанные в Институте защиты растений. Данные препараты внесены в «Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь». Их применяют в сельском и лесном хозяйстве против личинок колорадского жука на картофеле, белокрылки тепличной, трипса табачного на огурцах защищенного грунта, жуков короеда типографа в еловых насаждениях, личинок корнеобитающих вредителей на хвойных породах и подвоях, саженцах плодовых культур, двукрылых вредителей (сциариды, бабочницы, береговушки) на огурцах защищенного грунта.

Препараты выращивали на зерновых субстратах в бутылках (0,5; 0,7; 1 л) в течение месяца при $t = 26^\circ\text{C}$. В каждую бутылку помещали по 100 г среды. Продуктивность препаратов определяли следующим образом. 1 г субстанции (мицелий гриба на зернах сыпучих питательных сред) тщательно размешивали в 100 мл дистиллированной воды. Из полученных суспензий готовили последовательно десятикратные разведения. Титр спор в суспензиях определяли с помощью камеры Горяева.

Данные опыта представлены в таблице.

Влияние питательных сред на продуктивность, жизнеспособность и вирулентность изолятов 5-07, 13-07 и 20-08 энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*

Препараты	Питательные среды	Продуктивность $n \times 10^8$, спор/мл, спор/г	Жизнеспособность спор, %	Биологическая активность препаратов, %			Количество трупов, обросших мицелием <i>B. bassiana</i> , %
				на 6-е сутки	на 10-е сутки	на 14-е сутки	
Melobass	жидкая среда	3,6 ± 0,2	51,3 ± 1,4	11,9 ± 11,9	56,5 ± 15,4	62,4 ± 19,0	49,7 ± 9,9
Боверин	ячмень	5,1 ± 0,35	74,3 ± 1,4	48,0 ± 4,9	95,6 ± 4,4	100	34,3 ± 5,7
5-07	ячмень	25,5 ± 1,5	96,9 ± 1,3	100	–	–	60,0 ± 15,3
	пшеница	2,1 ± 0,1	70,5 ± 1,0	23,9 ± 11,6	52,2 ± 8,1	64,7 ± 11,0	8 ± 8,0
	перлов. крупа	4,6 ± 0,7	45,6 ± 1,2	51,9 ± 21,5	58,2 ± 21,6	68,2 ± 18,3	33,3 ± 21,1
	пшеница	1,2 ± 0,05	86,9 ± 0,7	15,9 ± 7,5	27,8 ± 9,8	38,8 ± 11,3	3,3 ± 3,3
НСР ₀₅		3,26	3,52	38,34	44,57	42,92	41,09
13-07	ячмень	5,65 ± 0,15	87,6 ± 0,5	93,6 ± 6,5	100	–	25,7 ± 9,5
	пшеница	6,0 ± 0,7	68,8 ± 1,5	48,0 ± 18,5	62,6 ± 22,9	62,4 ± 23,1	22,9 ± 14,7
	перлов. крупа	3,6 ± 0,15	65,6 ± 4,5	15,9 ± 11,6	47,8 ± 11,1	82,4 ± 11,8	25 ± 9,7
	пшеница	2,2 ± 0,2	90,9 ± 2,9	51,9 ± 13,6	95,6 ± 4,4	100	54,3 ± 9,5
НСР ₀₅		1,49	6,89	39,81	38,79	46,15	33,14
20-08	ячмень	17,7 ± 1,0	93,9 ± 0,2	77,4 ± 12,1	100	–	37,1 ± 7,3
	пшеница	2,95 ± 0,35	84,1 ± 3,5	71,9 ± 10,2	100	–	51,4 ± 7,3
	перлов. крупа	2,3 ± 0,25	12,9 ± 0,7	0	2,6 ± 2,6	18,8 ± 9,4	26 ± 12,5
	пшеница	1,7 ± 0,25	86,3 ± 1,3	3,9 ± 3,9	23,5 ± 7,2	82,4 ± 11,8	32 ± 11,8
НСР ₀₅		2,19	5,22	24,43	11,51	34,69	30,0
Контроль к препаратам 5-07, 13-07, 20-08 (ячмень)				11,4 ± 5,3	28,6 ± 11,1	31,4 ± 10,5	0
Контроль к остальным препаратам				28,6 ± 4,5	34,3 ± 3,5	51,4 ± 15,4	27,9 ± 11
Σ НСР ₀₅		1,76	4,39	32,08	31,63	38,81	30,73

Проведенные исследования показали, что наибольшая продуктивность спор наблюдается у изолятов 5-07 и 20-08 на ячмене ($25,5 \cdot 10^8$ и $17,7 \cdot 10^8$ спор/г) по сравнению с остальными средами. Меньшие значения продуктивности отмечены у данных изолятов на перловой крупе и пшенице. У изолята 13-07 наибольшая продуктивность выявлена на пшенице и ячмене ($6,0 \cdot 10^8$ и $5,65 \cdot 10^8$ спор/г). Более низкую продуктивность этот изолят имеет на перловой крупе ($3,6 \cdot 10^8$ спор/г). Самый низкий выход спор у всех изолятов оказался на пшенице.

Выход спор на ячмене у всех изолятов был выше в 1,1–5 раз, чем на эталоне («Боверин зерновой-БЛ»). Однако установлено, что продуктивность изолятов на всех исследуемых зерновых субстратах оказалась ниже по сравнению с тем же эталоном, кроме изолята 13-07, выращенного на пшенице. Выход спор гриба *Beauveria bassiana* на жидкой питательной среде (препарат «Melobass, пс.») тоже был невысокий ($3,6 \cdot 10^8$ спор/мл).

Если сравнить выход спор на исследуемых средах среди изолятов, то максимальная продукция спор наблюдается при культивировании изолята 5-07 на ячмене и перловой крупе ($25,5 \cdot 10^8$ и $4,6 \cdot 10^8$ спор/г) и изолята 13-07 на

пшенице и пшенице ($6,0 \cdot 10^8$ и $2,2 \cdot 10^8$ спор/г). Минимальный выход спор наблюдается у изолята 20-08 на перловой крупе ($2,3 \cdot 10^8$ спор/г) и у изолята 5-07 на пшенице и пшенице ($2,1 \cdot 10^8$ и $1,2 \cdot 10^8$ спор/г).

Таким образом, с точки зрения наработки спор наиболее оптимальными средами являются ячмень для всех изолятов и пшеница для изолята 13-07, что согласуется с данными Левченко М. В. Так, для штаммов ББК-1 (*B. bassiana*) и БТ-86 (*B. brongniartii*) более предпочтительно пшеница. Выход спор с пшеницы составил $38,72 \cdot 10^8$ и $18,35 \cdot 10^8$ спор/мл у ББК-1 и БТ-86 на 20-е сутки культивирования, соответственно [3]. В «Методических указаниях по применению биопрепарата на основе энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. против основных вредителей сельскохозяйственных культур» культивирование гриба для наработки препаративной формы осуществляют в 3-литровых банках на сыпучих субстратах, в качестве которых используют некондиционное зерно ячменя, пшеница, отруби [5].

В ходе данного эксперимента нами был проведен сравнительный анализ жизнеспособности спор изолятов при выращивании их на разных субстратах. Споры для анализа были

отобраны через 2 месяца после посева. Жизнеспособность спор изолятов (%) определяли методом посева суспензии спор на среду Чапека-Докса, разлитую на предметные стёкла, которые помещали в чашки Петри и содержали в термостате при $t = 20^{\circ}\text{C}$. Процент проросших спор учитывали через сутки. Полученные данные свидетельствуют о том, что жизнеспособность спор изолятов была достаточно высокой на ячмене (87,6–96,9%), пшенице (86,3–90,9%) и пшенице (68,8–84,1%). На перловой крупе уровень прорастания спор у изолятов 20-08 и 5-07 оказался невысокий (12,9–45,6%). У «Боверина зернового-БЛ» жизнеспособность спор составила 74,3%, у «Melobass, пс.» – 51,3%. По сравнению с «Боверином зерновым-БЛ» у изолятов 5-07 и 13-07 жизнеспособность спор оказалась выше на 22,6%; 12,6% и 13,3%; 16,6% на ячмене и пшенице, у изолята 20-08 – на 19,6%; 9,8%; 12% на ячмене, пшенице, пшенице. На остальных средах (пшено, перловая крупа) жизнеспособность была ниже на 3,8% и 5,5% для изолятов 5-07 и 13-07 на пшенице, на 28,7%; 8,7% и 61,4% для тех же изолятов и 20-08 на перловой крупе.

Кроме этого определяли биологическую активность изолятов на данных средах. Использовали метод биоанализа. В качестве тест-объектов применяли жуков кородея типографа, которых погружали в суспензию инокулюма. Титр рабочей суспензии исследуемых изолятов составил $1 \cdot 10^8$ спор в 1 мл суспензии. Титры суспензий определяли методом прямого подсчёта количества спор в счётной камере Горяева.

Для получения достоверного результата опыта использовали здоровую популяцию вредителя. Жуков кородея типографа привозили из очагов в коре и отрубках ели, которые помещали в боксы. Также выращивали жуков типографа в боксах на отрубках ели в лабораторных условиях. Вирулентность изолятов определяли, учитывая общий процент гибели насекомых и сокращение времени гибели от момента инфицирования до летального исхода. Биологическую активность (энтомоцидная активность, вирулентность) изолятов определяли по формуле Аббота с учетом смертности в контроле [6].

Опыты ставили в чашках Петри. В качестве корма использовали необработанный спорами гриба кусок еловой коры площадью 25 см^2 . Насекомых погружали в биологических пробирках в рабочий раствор, который составил 0,5 мл суспензии с добавлением следов детергента Твина 80. Затем жуков кородея типографа по 7 штук помещали в чашки Петри, которые заворачивали в полиэтилен для сохранения влажности и ставили в термостат при $t = 20^{\circ}\text{C}$. Повторность опыта 5-кратная, т. е. для каждого

варианта опыта использовали 35 жуков типографа. Учеты гибели насекомых проводили на 6-е, 10-е и 14-е сутки опыта.

Наибольшая биологическая активность выявлена у изолятов на ячмене. Данный показатель описали через LT_{100} – время, за которое погибает 100% насекомых, обработанных рабочим раствором препарата. $LT_{100} = 144$ ч для изолята 5-07, $LT_{100} = 240$ ч для изолятов 13-07 и 20-08 на выше указанной среде. На пшенице $LT_{100} = 240$ ч для изолята 20-08 и $LT_{100} = 336$ ч для «Боверина зернового-БЛ» и 13-07 на пшенице. На остальных вариантах опыта изоляты показали меньшую биологическую активность.

По сравнению с «Боверином зерновым-БЛ» изоляты проявили наибольшую биологическую активность на ячмене и пшенице (изолят 20-08). Энтомоцидная активность оказалась одинаковой у эталона и изолята 13-07 на пшенице ($LT_{100} = 336$ ч). На всех остальных вариантах вирулентность была ниже, чем на эталоне. У препарата «Melobass, пс.» энтомоцидная активность составила 62,4% на 14-е сутки опыта. Она оказалась выше на 23,6% и 43,6%, чем у изолята 5-07 на пшенице и 20-08 на перловой крупе на тот же срок учета. Выявлена одинаковая вирулентность у биопрепарата «Melobass, пс.» и изолята 13-07 на пшенице (62,4%). В остальных случаях биологическая активность исследуемого препарата оказалась ниже.

В эксперименте кроме биологической активности, продуктивности и жизнеспособности изолятов учитывали количество погибших в опыте жуков, которые проросли мицелием испытываемых изолятов гриба *Beauveria bassiana*, выраженное в процентах. Количество трупов, обросших мицелием, определяли непосредственно при учете смертности жуков на 6-е, 10-е и 14-е сутки опыта без помещения погибших жуков во влажную камеру.

Во время проведения опыта было отмечено обрастание погибших насекомых мицелием гриба *Beauveria bassiana* (3,3–60%), что указывает на то, что жуки гибнут именно от белого мускардиноза. На одном из контролей также были выявлены трупы, обросшие мицелием исследуемого гриба (27,9%), что свидетельствует о том, что в природе кородей типограф может быть заражен грибом *Beauveria bassiana*.

Заключение. В результате проведенных исследований наиболее оптимальными средами для наработки биопрепаратов являются ячмень для изолятов 5-07, 13-07, 20-08; пшено для изолята 20-08 и пшеница для изолята 13-07, так как на данных средах изоляты проявили наибольшую биологическую активность, жизнеспособность спор и продуктивность по сравнению с остальными средами.

Литература

1. Король И. Т. Микробиологическая защита растений: справочник. М.: Колос, 1993. 79 с.
2. Микульская Н. И. Продуктивность энтомопатогенных грибов при культивировании на разных составах питательных сред: материалы научной конференции «Стратегия и тактика защиты растений», Минск, 2006. Вып. 30, ч. 1. С. 484–487.
3. Левченко М. В. Биологическое обоснование использования энтомопатогенных гифомицетов для подавления численности вредных саранчовых: автореф. дис... канд. биол. наук: 17.02.07. Санкт-Петербург – Пушкин, 2007. 19 с.
4. Севницкая Н. Л. Влияние питательных сред на вирулентность и продуктивность энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. // Труды Института леса. 2013. Вып. 73: Проблемы лесоведения и лесоводства. С. 551–562.
5. Методические указания по применению биопрепарата на основе энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. против основных вредителей сельскохозяйственных культур / А. О. Сагитов. Алматы: Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений. 2011. 19 с.
6. Abbot W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide // *Econ. Entomol.* 1925. Vol. 18. P. 265–267.

References

1. Korol' I. T. *Mikrobiologicheskaya zashchita rasteniy: spravochnik* [Microbiological protection of plants: reference book]. Minsk, Kolos Publ., 1993. 79 p.
2. Mikul'skaya N. I. [Efficiency of the entomopathogenic fungus at cultivation on different structures of nutrient mediums]. *Materialy nauchnoy konferentsii "Strategiya i taktika zashchity rasteniy"* [Materials of the Scientific Conference "Strategy and tactics of plant protection"]. Minsk, 2006. Issue 30, part I, pp. 484–487 (In Russian).
3. Levchenko M. V. *Biologicheskoe obosnovanie ispol'zovaniya entomopatogennykh gifomitsetov dlya podavleniya chislennosti vrednykh saranchovykh: Avtoref. dis. kand. biol. nauk* [Biological basis of use of the entomopathogenic gufomycetes for suppression of number the harmful locust. Abstract of thesis cand. of biol. sci.]. St. Petersburg – Pushkin, 2007. 19 p.
4. Sevnitskaya N. L. The effect of nutrient media on virulence and productivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Trudy instituta lesa* [Proceedings of Forest Institute], 2013, issue 73: Problems of silvics and forestry, pp. 551–562 (In Russian).
5. Sagitov A. O. *Metodicheskie ukazaniya po primeneniyu biopreparata na osnove entomopatogenogo griba Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. protiv osnovnykh vreditel'ey sel'skokhozyaystvennykh kul'tur* [Methodical instructions on application of a biological preparation on the basis of an entomopathogenic fungus of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the main crop-eaters]. Almaty: Kazakhskiy nauchno-issledovatel'skiy institute zashchity i karantina rasteniy, 2011. 19 p.
6. Abbot W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Econ. Entomol.* 1925, vol. 18, pp. 265–267.

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 Natal'ya Leonidovna – researcher, 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 12.02.2016