

УДК: 632.4 : 57.083.18

**ИНСЕКТИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ФИТОПАТОГЕННЫХ АСКОМИЦЕТОВ****А.О. Берестецкий, Л.С. Аполлонова, С.В. Сокорнова, Т.Д. Черменская***Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург*

Проведена первичная оценка инсектицидной активности фитопатогенных аскомицетов по отношению к виковой тле (*Megoura viciae*). Культуральный фильтрат девяти (45%) из 20 изученных изолятов грибов проявил инсектицидную активность по отношению к виковой тле (*Megoura viciae*). Экстракты из культурального фильтрата и мицелия патогена мака *Brachycladium paraveris* показали более высокую афицидную активность, чем эталонный коммерческий инсектицид. Таким образом, фитопатогенные аскомицеты могут являться продуцентами инсектицидных метаболитов.

**Ключевые слова:** фитопатогены, аскомицеты, афицидная активность, виковая тля.

О взаимоотношениях грибов и насекомых известно достаточно много. С одной стороны, грибы (преимущественно аскомицеты) являются первичными или вторичными патогенами насекомых, с другой стороны, некоторые виды насекомых – мицетофаги. Кроме того, крайне интересны и недостаточно изучены отношения между насекомыми-фиитофагами и фитопатогенными грибами. Занимая одну экологическую нишу – определенный орган растения-хозяина, – они, как правило, конкурируют за субстрат [Hatcher, 1995; Kluth et al., 2002; Dickson, Mitchell, 2010]. Насекомые могут быть переносчиками спор грибов, что на практике интересно для биологической борьбы с сорняками, либо для разработки профилактических мер борьбы с заболеваниями культурных растений [Hill et al., 2003; Feldman et al., 2008]. Много работ посвящено устойчивости растений к патогенам, индуцированной насекомыми, и наоборот [Moultet et al., 2011; Voucias et al., 2012].

Полагают, что патогенность для насекомых среди сумчатых и несовершенных грибов (в том числе, фитопатогенных) не является редким, необычным феноменом [Борисов и др., 2001]. Так, из культурального фильтрата, полученного в результате ферментации возбудителя сетчатой пятнистости листьев ячменя (*Pyrenophora teres*) на

ряде жидких питательных сред, выделен и в 1996 г. запатентован ряд инсектицидных метаболитов [Manker et al., 1996]. У некоторых фитопатогенных грибов выявлены метаболиты с инсектицидными свойствами, характерные для энтомопатогенов. Так, деструксин В отвечает за патогенные свойства фитопатогенного гриба *Alternaria brassicae* и энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* [Vey et al., 2001]. Фоменол обнаружен у *Nigrospora sacchari* и *Hirsutella thompsonii* var. *synnematososa* [Fukushima et al., 1998], боверицин – у *Beauveria bassiana*, видов *Isaria* и некоторых фитопатогенных видов рода *Fusarium* [Wang, Xu, 2012]. Эти данные предполагают неизученную до сих пор возможную эволюционную связь между некоторыми видами энтомопатогенных и фитопатогенных грибов, а также более широкую представленность продуцентов-хеморегуляторов поведения насекомых среди микроорганизмов филлосферы.

Целью данного исследования было проведение первичной оценки инсектицидной активности фитопатогенных аскомицетов по отношению к виковой тле (*Megoura viciae* Buckton) и определение дальнейших перспектив поиска и изучения хеморегуляторов поведения насекомых, образуемых упомянутой группой грибов.

**Материалы и методы**

Для изучения инсектицидной активности использовали 20 изолятов фитопатогенных грибов из рабочей коллекции лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР (табл. 1). Четыре из них отобрали для определения влияния продолжительности культивирования на их афицидную активность (табл. 2). Штамм *Brachycladium paraveris* N 30 был использован для изучения инсектицидной активности его экстрактов в сравнении с коммерческим ботаническим инсектицидом нимацаль (*Neemazal* TS, *Trifolium*, Германия).

Грибы культивировали в 100-мл конических колбах на двух жидких питательных средах (25 мл/колбу): глюкозо-аспаргиновой среде (ГА) и синтетической среде М-1-D. Культуры грибов инкубировали стационарно 3 недели при переменном освещении (12 ч в день) и постоянной температуре 24°C. Для биологической оценки использовали супернатант, полученный в результате центрифугирования культуральной жидкости 10 мин при 14000 об/мин. Определение антибиотической активности проводили методом бумажных дисков.

Гриб, показавший максимальную афицидную активность, культивировали 14 суток на жидкой питательной среде М-1-D общим объемом 1 л. После отделения биомассы на фильтровальную бумагу культуральный фильтрат (850 мл) последовательно экстрагировали гексаном, хлористым метилом, диэтиловым эфиром и этилацетатом по 300 мл дважды. Высушенный мице-

лий вместе с фильтровальной бумагой экстрагировали 96% этанолом объемом 100 мл сначала 1 час, затем – 1 сутки. Растворители отгоняли на ротормном испарителе, после чего оценивали инсектицидную активность полученных экстрактов. Хроматографическое разделение экстрактов проводили при помощи ТСХ в системе гексан–ацетон–уксусная кислота (70:30:1); хроматограммы проявляли 10%-м раствором серной кислоты в этаноле при температуре 110°C.

Для определения контактной инсектицидной активности культурального фильтрата и экстрактов грибов использовали лабораторную культуру виковой тли (*Megoura viciae*), которую содержали при температуре 24°C и 16-часовом световом дне на проростках бобов.

Для первичной оценки инсектицидной активности грибов использовали культуральный фильтрат, которым пропитывали диски фильтровальной бумаги диаметром 3.6 см (250 мкл/диск) в пластиковой чашке Петри диаметром 4 см. Затем в чашки вносили личинок тли старшего возраста (около 20 особей/чашку). В качестве контроля использовали чистые питательные жидкие среды.

Для оценки инсектицидной активности экстрактов на фильтровальную бумагу наносили 250 мкг сухого вещества в ацетоне (в контроле – только растворитель), после упаривания которого бумагу пропитывали 250 мкл дистиллированной воды и перено-

силы в чашку Петри. В качестве эталона (положительного контроля) – 0.4%-й раствор препарата нимацаль. Опыт выполнен в 4 повторностях. Через 4 часа инкубации при искусственном

освещении и температуре 24°C проводили учет уровня смертности тли. О биологической эффективности экстрактов судили по среднему проценту гибели вредителя по сравнению с контролем.

**Результаты и обсуждение**

Культуральный фильтрат девяти (45%) из 20 изученных изолятов вызывал гибель тли. При культивировании грибов на среде ГА выявлено 6 потенциальных продуцентов инсектицидных веществ, на среде М-1-Д – 7. Заметную инсектицидную активность (более 30% погибших особей) проявил культуральный фильтрат пяти изолятов грибов: *Ascochyta* sp. N 8, *Phoma exigua* N 23, *Phoma* sp. K-44, *Septoria* sp. N 27, *Verticillium dahliae* N 33. Однако 100%-ю гибель насекомых не наблюдали. Важно отметить афицидную активность двух изолятов грибов из рода *Septoria*, относящихся к типичным патогенам растений (табл. 1). Химия грибов этого рода изучена недостаточно, чтобы предполагать наличие каких-либо инсектицидных веществ. Не известны также и данные о инсектицидной активности *Phoma exigua* и *V. dahliae*. Антибиотическая активность культурального фильтрата грибов к *B. subtilis* была слабой (зона лизиса не более 6 мм) или отсутствовала, поэтому трудно говорить о какой-либо её связи с афицидной активностью (табл. 1).

Таблица 1. Афицидная и антибактериальная активность 3-недельного культурального фильтрата 20 изолятов грибов в зависимости от состава жидкой питательной среды

Вид гриба	Изолят*	Тест-организм			
		<i>Megoura viciae</i> (обездвиженные особи, % к контролю)		<i>Bacillus subtilis</i> (зона лизиса, мм)	
		ГА	М-1-Д	ГА	М-1-Д
<i>Alternaria simmonsii</i>	S-142	0	20	0	0
<i>Ascochyta pisi</i>	N 1	20	0	0	0
<i>Ascochyta</i> sp.	S-6/ N 8	0	35	0	0
<i>Brachycladium papaveris</i>	P-1.39/30	16	30	0	0
<i>Phoma chenopodiicola</i>	N 6	0	0	3.3	0
<i>Phoma exigua</i>	N 23	0	38	1.5	0
<i>Phoma exigua</i>	C-240/ N 35	0	0	2.5	5.0
<i>Phoma</i> sp.	K-44	10	44	0	0
<i>Septoria sonchi</i>	S-9.206.3	26	10	0	0
<i>Septoria</i> sp.	N 27	42	0	0	0
<i>Verticillium dahliae</i>	C-310/N 33	46	50	0	5.8
Контроль		0	5	0	0

\* Не отмечена афицидная и антибактериальная активность у изолятов: C-363 *Alternaria cirsinoxia*, S-106 *A. sonchi*, N 15 *A. tenuissima*; S-112 *Ascochyta tussilaginis*; S-129 *Botryosphaeria* sp.; N S-12911 *Colletotrichum lupini*; 15-11/ N 19 *Phoma sanguinolenta*; K-85/N 36 *Pseudosphaerulina cannabina*; S-47/N 32 *Stagonospora cirsi*.

В повторном эксперименте с использованием 4 изолятов отобранных грибов наибольшая афицидная активность была зафиксирована у двухнедельного культурального фильтрата *B. papaveris* N 30. При культивировании гриба на среде М-1-Д афицидная активность культурального фильтрата была около 40%, на среде – более 60%. Активность культурального фильтрата остальных грибов

не превышала 25%. Причём, при культивировании грибов на среде М-1-Д она была в среднем выше, чем на среде ГА. Пик активности у различных изолятов грибов проявлялся в различные сроки культивирования; в частности, у *B. papaveris* – на 14 сутки роста (табл. 2). *B. papaveris* – возбудитель гельминтоспориоза мака снотворного перспективен как потенциальный микогербицид против него [O'Neill et al, 2000; Гасич и др., 2011]. Данные о возможных трофических связях *B. papaveris* с насекомыми в литературе отсутствуют.

Таблица 2. Афицидная активность (% к контролю) культурального фильтрата фитопатогенных грибов по отношению к виковой тле

Гриб	Среда	Срок культивирования, недель			
		1	2	3	4
<i>Ascochyta</i> sp. 8	ГА	7.6	0	1.3	8.8
	М-1-Д	13.3	8.4	7.6	11.3
<i>Alternaria simmonsii</i> S-142	ГА	7.6	3.6	7.5	2.5
	М-1-Д	5.0	10.2	25.3	3.7
<i>Brachycladium papaveris</i> N 30	ГА	5.7	43.6	6.3	3.8
	М-1-Д	15.0	64.4	11.3	0
<i>Verticillium dahliae</i> N 33	ГА	7.6	7.2	5	2.9
	М-1-Д	16.7	5.1	5.1	1.6

Чтобы подтвердить способность отобранных изолятов грибов образовывать инсектицидные метаболиты в качестве модельного микроорганизма использовали изолят *B. papaveris* N 30. Из культурального фильтрата и мицелия двухнедельной культуры гриба были получены экстракты для оценки их активности. Максимальную инсектицидную активность (более 75%) показал гексановый экстракт из культурального фильтрата. Активность других экстрактов из культурального фильтрата не превышала 18%. Высокую биологическую эффективность (около 60%) проявил этанольный экстракт из мицелия гриба. В положительном контроле – при использовании коммерческого природного инсектицида – гибель тли была на уровне 50%. В контроле смертность насекомых была не выше 17.5% (табл. 3). В дальнейшем необходимо выделение индивидуальных соединений из нативной жидкости и ми-

Таблица 3. Биологическая эффективность экстрактов (0.1%) из культурального фильтрата и мицелия *Brachycladium papaveris* N 30, выращенного на среде M1D

Экстракт	Выход, мг/мл	Смертность тли, %	Биологическая эффективность, % к контролю
Гексановый	9.2	78.8 a	74.3
Хлористометиленовый	5.9	20.0 b	3.0
Эфирный	4.4	32.5 c	18.2
Этилацетатный	17.2	27.5 bc	12.1
Водный остаток	-	36.3 c	22.8
Этанольный (мицелия)	-	66.3 d	59.2
Neemazal TS 0,4%	-	48.8 cd	-
Контроль	-	17.5 b	-

Примечание. Значения, отмеченные разными буквами, существенно различаются при p<0.05.

целия гриба и подтверждение их афицидной активности. Известно также, что экстракты, полученные из нативной жидкости и мицелия *B. papaveris*, проявляют также фитотоксическую и антифунгальную активность [Титова и др., 2013], что увеличивает интерес к дальнейшему исследова-

нию метаболитов гриба.

Таким образом, на основании проведенных исследований экспериментально показана потенциальная возможность фитопатогенных аскомицетов образовывать инсектицидные метаболиты.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 12-04-00853).

Plant Protection News, 2015, 3(85), p. 56 – 58

## INSECTICIDAL PROPERTIES OF PHYTOPATHOGENIC ASCOMYCETES

A.O. Berestetskiy, L.S. Apollonova, S.V. Sokornova, T.D. Chermenskaya

All-Russian Institute of Plant Protection, St Petersburg, Russia

Insecticidal activity of phytopathogenic ascomycetes (20 isolates) was evaluated using *Megoura viciae* as a test model. Culture filtrate of 9 isolates (45% of the total amount) showed aphicide activity. Extracts obtained from culture filtrate and mycelium of *Brachycladium papaveris*, a pathogen of *Papaver* spp., were significantly more active than an etalon commercial botanic insecticide. These data shows a potential ability of plant pathogenic fungi to produce insect regulators.

**Keywords:** plant pathogen; ascomycete; aphicide activity; *Megoura viciae*.

### Библиографический список (References)

- Борисов Б.А., Серебров В.В., Новикова И.И., Бойкова И.В. Энтмопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. Под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. С. 352–427.
- Гасич Е.Л., Ганнибал Ф.Б., Берестецкий А.О., Казарцев И.А., Хлопунова Л.Б., Терлецкий В.М., Бекяшева Е.Н. Таксономически значимые признаки *Crivellia papaveracea* и *Brachycladium papaveris* — патогенов мака, обнаруженных в России и Украине // Микология и фитопатология, 2013. 47. С. 240–251.
- Титова Ю.А., Шенин Ю.Д., Павлюшин В.А., Краснобаева И.Л. Вторичные эндометаболиты штамма *Brachycladium papaveris* 1.39 и его реинтолятов // Микология и фитопатология. 2013. 47. С. 266–273.
- Boucias D. G., Lietze V.-U., Teal P. Chemical signals that mediate insect-fungal interactions // Biocommunication of Fungi. Ed. G. Witzany. Dordrecht, Heidelberg, New-York, London: Springer. 2012. P. 305–336.
- Dickson T.L., Mitchell C.E. Herbivore and fungal pathogen exclusion affects the seed production of four common grassland species // PLoS ONE. 2010. 5, e12022.
- Feldman T. S., O'Brien H. E., Arnold A. E. Moths that vector a plant pathogen also transport endophytic fungi and mycoparasitic antagonists // Microb. Ecol. 2008. 56. P. 742–750.
- Fukushima T., Tanaka M., Gohbara M., Fujimori T. Phytotoxicity of 3 lactones from *Nigrospora sacchari* // Phytochemistry. 1998. 4. P. 625–630.
- Hatcher P.E. Three-way interactions between plant pathogenic fungi, herbivorous insects and their host plants // Biological Reviews. 1995. 70. P. 639–694.
- Hill R.L., Fowler S.V., Wittenberg R., Barton J., Casonato S., Gourlay A.H., Winks C. *Phytomyza vitalbae*, *Phoma clematidina*, and insect-plant pathogen interactions in the biological control of weeds. In: Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds (eds.: Cullen, J.M., Briese, D.T. Criticos, D.J., Lonsdale, W.M., Morin, L. and Scott, J.K.), Canberra, Australia: CSIRO Entomology. 2003. P. 48–56.
- Kluth S., Kruess A., Tschamtkte T. Insects as vectors of plant pathogens: mutualistic and antagonistic interactions // Oecologia, 2002, 133, P. 193–199.
- Manker D. C., Rosendahl C. N., Heide M., Bachmann T. L., Nielsen R. I. Fungicidal and insecticidal compounds and compositions derived from fungal strains of *Pyrenophora teres*. United States Patent № 5491122, 1996.
- Mouttet R., Bearez P., Thomas C., Desneux N. Phytophagous arthropods and a pathogen sharing a host plant: evidence for indirect plant-mediated interactions. PLoS ONE, 2011, 6, e18840.
- O'Neill, N. R., Jennings, J. C., Bailey, B. A., Farr, D. F. *Dendryphon penicillatum* and *Pleospora papaveracea*, destructive seedborne pathogens and potential mycoherbicides for *Papaver somniferum*. // Phytopathology, 2000. 90. P. 691–698.
- Vey A., Hoagland R., Butt T.M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents // Fungi as biocontrol agents. Wallingford: CAB International. 2001. P. 311–345.
- Wang Q., Xu L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review // Molecules, 2012. 17. P. 2367–2377.

### Translation of Russian References

- Borisov B.A., Serebrov V.V., Novikova I.I., Boikova I.V. Entomopathogens of ascomycetes and deuterocetes. In: Pathogens of insects: structural and functional aspects. Pod red. V.V. Glupova. Moscow: Kruglyi god, 2001. P. 352–427. (In Russian).
- Gasich E.L., Gannibal F.B., Berestetskiy A.O., Kazartsev I.A., Khlopuнова L.B., Terletskii V.M., Bekyasheva E.N. Taxonomically significant characters of *Crivellia papaveracea* and *Brachycladium papaveris* - poppy pathogens found in Russia and Ukraine. Mikologiya i fitopatologiya, 2013. 47. P. 240–251. (In Russian).
- Titova Yu.A., Shenin Yu.D., Pavlyushin V.A., Krasnobaeва I.L. Secondary endometabolites of of *Brachycladium papaveris* 1.39 strain and its reisolates. Mikologiya i fitopatologiya. 2013. 47. P. 266–273. (In Russian).

### Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург – Пушкин, Российская Федерация  
 \*Берестецкий Александр Олегович. Зав. лабораторией, кандидат биологических наук, e-mail: aberestetski@yahoo.com  
 Сокорнова Софья Валерьевна. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: mymryk@gmail.com  
 Черменская Таисия Дмитриевна. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: tchermenskaya@yandex.ru  
 Аполлонова Лариса Станиславовна

\* Ответственный за переписку

### Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St Petersburg – Pushkin, Russian Federation  
 \*Berestetskiy Alexander Olegovich. Head of Laboratory, PhD in Biology, e-mail: aberestetski@yahoo.com  
 Sokornova Sof'ya Valerievna. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: mymryk@gmail.com  
 Chermenskaya Taisiya Dmitrievna. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: tchermenskaya@yandex.ru  
 Apollonova Larisa Stanislavovna

\* Responsible for correspondence