

УДК 574.472

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ПРИМАНОК ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ АСКОМИЦЕТОВ (*ASCOMYCOTA*, *HYPOCREALES*) ИЗ ПОЧВ

М.В. Тюрин, В.Ю. Крюков, О.Г. Томилова, О.Н. Ярославцева, Н.А. Крюкова, В.В. Глупов

Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия, taktolt@mail.ru

Использование личинок *Galleria mellonella*, парализованных ядом *Habrobracon hebetor*, повышает чувствительность метода ловушек для выделения энтомопатогенных грибов из почв более чем в 190 раз. Модифицированный метод позволяет изолировать грибы из почвы с очень низкими концентрациями конидий (20–30 конидий / г. почвы). Метод успешно опробован для микологического анализа почв из разных регионов: от лесотундры до степей.

Ключевые слова: аскомицеты, патогены, метод приманок, почва, яды животных, *Habrobracon hebetor*, *Galleria mellonella*.

Энтомопатогенные аскомицеты – важнейшие компоненты наземных биоценозов, образующие симбиотические связи с растениями, регулирующие численность членистоногих, а также активно применяемые в технологиях производства органической сельскохозяйственной продукции [Lacey et al., 2015]. В настоящее время используются различные методы выделения энтомопатогенных аскомицетов из почв. Один из самых распространенных и наименее трудоемких является метод приманок или байт-метод [Zimmermann, 1986]. Однако, одно из ограничений данного метода связано с разным уровнем восприимчивости насекомых-приманок к определенным видам грибов [Sheepmaker, Butt, 2010]. Ранее нами было установлено, что поражение личинок *G. mellonella* ядом эктопаразитоида *Habrobracon hebetor* (лабораторная популяция) приводит к резкому (5000-кратному) повышению восприимчивости огневки к энтомопатогенным грибам [Крюков et al., 2013], что связано с сильным ингибированием иммунитета насекомых под действием яда [Крюкова et al., 2011, 2015]. На основании этого был модифицирован метод приманок для выделения из почвы энтомопатогенных аскомицетов.

При использовании в качестве приманок личинок огневки *G. mellonella*, парализованных ядом паразитоида *H. hebetor*, удалось повысить чувствительность данного метода в 193 раза. Так, при использовании парализованных личинок полулетальная доза (LC_{50}) для развития микоза *B. bassiana* составила всего 28 конидий/грамм почвы, тогда как при использовании интактных личинок полулетальная доза составила 5434 конидий/грамм почвы. Метод

успешно применен при микологическом анализе почв из различных природных зон – от лесотундр до степей. Для подавляющего большинства исследуемых образцов ($n=17$) отмечено статистически достоверное увеличение доли личинок с развившимся микозом после парализации ядом ($F_{1,16} = 65.6$, $p = 0.000001$) при этом грибы р. *Metarhizium* и *Cordyceps* были изолированы только из парализованных гусениц.

Следует отметить, что из трупов, парализованных ядом, выделялись преимущественно энтомопатогенные грибы (*Beauveria* и *Metarhizium*), хотя в ряде случаев отмечался поверхностный рост сапротрофных грибов (*Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*). В лабораторных опытах с использованием энтомопатогенных грибов с различной специализацией (*Beauveria bassiana*, *Lecanicillium muscarium*, *Metarhizium pemphigi*, *Cordyceps militaris*), а также сапротрофов (*Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*) было показано, что мумификация парализованных ядом личинок происходит только при инфицировании энтомопатогенными грибами, но не сапротрофами. После инокуляции сапротрофами наблюдается лишь поверхностный рост грибов.

Таким образом, усовершенствованный метод позволяет изолировать грибы при их низкой численности (20–30 конидий/грамм почвы) в том числе в сухих стациях (степи), где выделение грибов общепринятыми методами является довольно трудоемким процессом. Кроме того, полученные данные подтверждают гипотезу о необходимости стресса у насекомых для успешного развития энтомопатогенных аскомицетов.

Библиографический список (References)

- Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future // J. Invertebr. Pathol. 2015. V. 132. P. 1–41.
- Kryukov V.Yu., Kryukova N.A., Glupov V.V. Susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to anamorphic entomopathogenic ascomycetes under envenomation and parasitization by *Habrobracon hebetor* // Russ. J. Ecol., 2013, V. 44, N. 1, P. 89–92.
- Kryukova N.A., Dubovskiy I.M., Chertkova E.A., Vorontsova Ya.L., Slepneva I.A., Glupov V.V. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae // J. Insect Physiol. 2011. V. 57. N. 6. P. 796–800.
- Sheepmaker J.W.A., Butt T.M. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations // Biocontr. Sci. Tech. 2010. V. 20. N. 5. P. 503–552.
- Zimmermann G. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil // J. Appl. Entomol. 1986. V. 102. P. 213–215.

IMPROVEMENT OF BAIT METHOD FOR ISOLATION OF ENTOMOPATHOGENIC
ASCOMYCETES (ASCOMYCOTA, HYPOCREALES) FROM SOIL

M.V. Tyurin, V.Yu. Kryukov, O.G. Tomilova, O.N. Yaroslavtseva, N.A. Kryukova, V.V. Glupov

Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, maktolt@mail.ru

Using of *Galleria mellonella* larvae envenomated with ectoparasitoid *Habrobracon hebetor* strong increases the test-sensitivity of bait method to isolation of entomopathogenic fungi from soil. The modified method allows to isolate fungi from soil with very low concentrations (20–30 conidia/g. of soil). The method successfully tested for mycological analysis of soils from different regions: from forest-tundra to the steppes.