Л.И.Прищепа, *кандидат биологических наук*
Е.Н.Янковская, *аспирантка*
Белорусский НИИ защиты растений
УДК 632.937.14:632.752.1

Вирулентность местных штаммов мускардинных грибов для тепличной белокрылки (Trialeurodes vaporariorum Westw.)

В статье приведены результаты поиска в природных биоценозах и изучения биологических и инсектицидных свойств энтомопатогенных грибов Metarrhizium anisopliae (Metch) Sor. и Paecilomyces fumoso-roseus (Wize) Brown et Smith. В результате выделен в чистую культуру ряд местных штаммов M.anisopliae и P. fumoso-roseus. Изучены их морфолого-культуральные признаки, энтомоцидная активность по отношению к лабораторному тест-объекту (гусеницам большой вощинной моли Galleria mellonella L.) и к целевому объекту (личинкам тепличной белокрылки Trialeurodes vaporariorum Westw.). Как наиболее перспективные в качестве продуцентов биологических препаратов отобраны штаммы P. fumoso-roseus П97, 3/1и 7/5. Для наиболее активного из них (штамм P.fumoso-roseus 3/1) определены значения среднелетальной концентрации ($ЛК_{50}$) для личинок белокрылки II-III и IV возраста.

The results of search in natural bio-coenosis and study of biological and the insecticide properties of entomo-pathogenic fungi Metarrhizium anisopliae (Metsch.) Sor. And Paecilomyces fumoso-roseus (Wize) Brown et Smith are indicated in the article. As a result the number of M.anisopilae and P.fumoso-roseus local strains is isolated. Their morphological and cultural signs, enthomocidal activity in relation to the laboratory test-object (wax moth Galleria mellonella L.larvi) and to the target object (greenhouse whitefly Trialeurodes vaporariorum Wstw.larvi) are studied. As the most perspective as producer of biological preparations the strains of P.funoso-roseus P97,3/1 and 7/5 are selected. For the most active among them (the strain of P.fumoso-roseus 3/1) the values of medium lethal concentration (LC_{50}) for II-III and IV instar larvi are determined.

Одним из естественных регулирующих факторов численности насекомых являются эпизоотии, вызываемых различными энтомопатогенными микроорганизмами, в том числе и грибами. Патогенность для насекомых-фитофагов и способность к росту на искусственных питательных средах создают предпосылки для применения их в защите сельскохозяйственных культур от вредителей. Согласно литературным данным [4, 5, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24] инсектицидные препараты на основе таких видов энтомопатогенных грибов, как Metarrhizium anisopliae (Metch) Sor. (возбудитель зеленого мускардиноза) и Paecilomyces fumoso-roseus (Wize) Brown et Smith (возбудитель розового мускардиноза) (кл. Deuteromycetes, пор. Moniliales, сем. Moniliaceae) широко применяются в практике защиты растений за рубежом. Известно лишь одно сообщение о выделении указанных видов грибов на территории Беларуси [11]. Направленное же изучение возможности их практического использования до настоящего времени не проводилось.

В 1997 г. из почвы (Минский р-н, д. Прилуки) были выделены штаммы M.anisopliae П97 и P.fumoso-roseus П97. Видовая принадлежность подтверждена специалистами Института экологии Польской академии наук. С использованием этих двух штаммов в 1998 г. была проведена оценка чувствительности некоторых вредителей защищенного грунта (тепличная белокрылка Trialeurodes vaporariorum Westw., обыкновенный паутинный клещ Tetranychus urticae Koch., минирующая муха Liriomyza sp.) к M.anisopliae и P.fumoso-roseus. В результате у всех перечисленных насекомых была выявлена определенная степень восприимчивости. Высокая биологическая эффективность (83,1%) отмечена при применении P.fumoso-roseus против тепличной белокрылки [17], что вполне согласуется с сообщениями ряда авторов о наличии активности у P.fumoso-roseus и M.anisopliae по отношению к этому вредителю и успешном применении в борьбе с ним [4, 13, 15, 20, 22]. На основании результатов проведенной предварительной оценки вирулентности и анализа литературных сведений использование местных штаммов P.fumoso-roseus и M.anisopliae, высокоактивных по отношению к тепличной белокрылке, в качестве агентов биологического контроля численности этого вредителя представляется нам перспективным и актуальным. В настоящем сообщении приводятся результаты исследований по поиску, выделению энтомопатогенных грибов M.anisopliae и P.fumoso-roseus из природных биоценозов Беларуси и последующей оценке энтомопатогенных свойств с целью определения возможности их использования как продуцентов микоинсектицидов.

Материалы и методы исследования

При проведении в 1998 г. поиска энтомопатогенных грибов M.anisopliae и P.fumoso-roseus сбор почвенных образцов вели на территории Витебской, Минской и Брестской областей. Выделение грибов из почвы вели согласно методу "насекомого-ловушки" [25] с использованием гусениц большой вощинной моли Galleria mellonella L. при постоянной температуре (26 °С). Выделение чистых культур грибов проводили в соответствии с рекомендациями А.А.Евлаховой [3] и "Большого практикума по микробиологии" (под ред. Г.Л.Селибера) [1]. При идентификации выделенных штаммов использовали руководства Евлаховой А.А. [3], Коваль Э.З. [7], Литвинова М.А. [10]. Изучение морфологических особенностей проводили при культивировании на агаризованных питательных средах (среда сусло-агар, среда Чапека). При определении вирулентности выделенных штаммов для лабораторного тест-объекта (большой вощинной моли) гусениц инфицировали путем погружения в водную суспензию конидий с титром $5 \cdot 10^8$ /мл. Зараженных насекомых содержали при постоянной температуре (26 °С). Погибших гусениц помещали во влажную камеру при 26 °С. Итоговый учет гибели проводили на 21-е сутки после заражения. Сравнительную вирулентность штаммов для личинок тепличной белокрылки (II-III возраст) определяли в вегетационных опытах: растения фасоли, заселенные вредителем, однократно обрабатывали водной суспензией конидий. Титр суспензии — $1 \cdot 10^9$ спор/мл. В контрольном варианте растения обрабатывали водопроводной водой. Итоговый учет численности вредителя проводили на 15-е сутки после обработки. Определяли биологическую эффективность действия [8]. Среднелетальную концентрацию ($ЛК_{50}$) суспензии конидий для личинок белокрылки определяли в вегетационных опытах согласно общепринятой методике: растения фасоли, заселенные одновозрастной популяцией вредителя (личинки II-III или IV возраста), обрабатывали однократно водными суспензиями конидий различной концентрации, учет гибели вредителя проводили на 15-е сутки после обработки [8].

Результаты исследований

Создание любого биологического препарата — многостадийный процесс. В целом, обобщая разработки различных авторов [8, 9], схему отбора перспективных штаммов-продуцентов грибных препаратов можно представить следующим образом: выделение первичных изолятов из природы, их идентификация, отбор колоний гриба по морфологическим признакам при росте на агаризованных средах, по продуктивности и синхронности конидиеобразования. Вирулентность наиболее продуктивных изолятов определяют на лабораторном тест-объекте, окончательное суждение об энтомопатогенных свойствах выносят после тестирования его на целевом виде вредителя. При проведении исследования мы посчитали целесообразным придерживаться данной схемы.

В ходе выделения M.anisopliae и P.fumoso-roseus из почвенных образцов было проанализировано 369 гусениц, погибших от микозов: гибель 163 из них была вызвана P.fumoso-roseus, 3 — M.anisopliae, 18 — B.bassiana. В чистую культуру выделены 2 штамма M.anisopliae и 11 — P.fumoso-roseus.

Таблица. Сравнительная вирулентность местных штаммов P.fumoso-roseus для личинок тепличной белокрылки (II-III возраст)

Вариант	Численность личинок, особей/ поле зрения бинокуляра (увеличение×4)		Биологическая эффективность,%
	до обработки	на 15-е сутки после обработки	
Контроль	19	19	
П97	13	5	62
3/1	16	3	81
7/5	11	3	73

Ряд авторов [2, 14] сообщает о корреляции между морфолого-культуральными особенностями и высокой вирулентностью: колонии высоковирулентных штаммов отличаются плоской порошистой поверхностью, низким воздушным мицелием, обилием спор. К тому же наличие подобных свойств дает основание предполагать, что штамм будет обладать высокой продуктивностью в условиях массового культивирования. В результате изучения характера роста выделенных штаммов на агаризованных средах вышеперечисленные особенности морфологии нами были отмечены у следующих: P.fumoso-roseus 1/3, 2/4, 4/1,7/5 и 7/6 и M.anisopliae П97, 8/1 и 8/2.

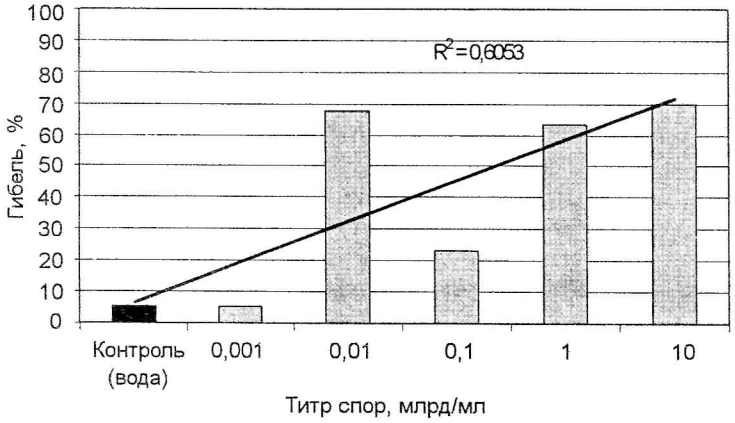

Рис. 1. Определение ЛК50 P.fumoso-roseus 3/1 для личинок тепличной белокрылки II-III возраста

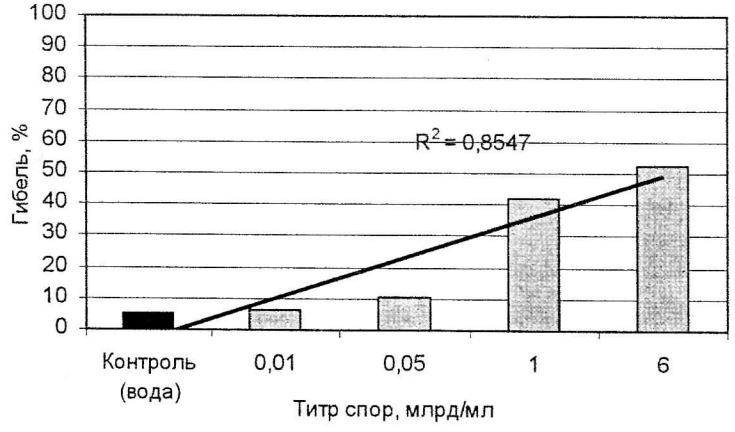

Рис. 2. Определение ЛК50 P. fumoso-roseus 3/1 для личинок тепличной белокрылки IV возраста

Согласно литературным сведениям [6, 12, 16] большая часть выделяемых из природы штаммов мускардинных грибов обладает низкой патогенностью. Поэтому следующим этапом после выделения из природы, идентификации и отбора по морфологическим признакам было определение сравнительной вирулентности по отношению к лабораторному тест-объекту — гусеницам большой вощинной моли (Galleria mellonella L.). Оценивали энтомоцидную активность 14 штаммов. Гибель тест-объекта варьировала в пределах от 0 до 40%. Установлено, что наиболее активными являлись штаммы P.fumoso-roseus П97, 3/1 и 7/5, вызвавшие гибель 29,6; 40,0 и 27,8% насекомых соответственно.

На следующем этапе определяли вирулентность 3 отобранных штаммов P.fumoso-roseus (П97, 3/1 и 7/5) для целевого объекта — тепличной белокрылки. Активность их по отношению к личинкам II-III возраста была высокой: биологическая эффективность на 15-е сутки составила 62,4-81,1% (табл.). Результаты оценки вирулентности для личинок белокрылки коррелировали с полученными данными о таковой для гусениц большой вощинной моли (рис.1): наибольшей активностью также обладал штамм 3/1, его биологическая эффективность составила 81,1%. Начало гибели личинок во всех вариантах отмечали на 7-е сутки после обработки: тело насекомых утрачивало прозрачность, становилось матовым, высохшим, отдельные особи были покрыты налетом мицелия со спороношением. Число личинок с признаками гибели от мускардиноза с течением времени увеличивалось. На 15-е сутки после обработки в вариантах с применением штаммов 3/1 и 7/5 большинство погибших личинок было покрыто мицелием со спороношением, что может служить условием для дальнейшего распространения и циркуляции патогена в популяции вредителя.

Одной из важнейших характеристик продуцента микоинсектицида является значение среднелетальной концентрации ($ЛК_{50}$) — титр суспензии спор, которая вызывает гибель 50% особей вредителя. Определены значения $ЛК_{50}$ штамма P.fumoso-roseus 3/1, как наиболее вирулентного по отношению к тепличной бело-

крылке (рис. 1-2). Для личинок II-III возраста она составила 0,7 млрд. конидий/мл, для личинок IV возраста – 5 млрд. конидий/мл. Установленные значения среднелетальной концентрации могут служить основанием для расчета дозы расхода при практическом применении P.fumoso-roseus против тепличной белокрылки.

Следует отметить наличие у штамма P.fumoso-roseus 3/1 активности по отношению к личинкам IV-го возраста (нимфам). Указанная особенность штамма 3/1 — весьма перспективна и требует дополнительного изучения, так как тепличная белокрылка на нимфальной стадии развития является наиболее устойчивой к действию химических инсектицидов и мало восприимчивой к патогенам [4].

Таким образом, в результате проведенного поиска мускардинных грибов M.anisopliae и P.fumoso-roseus в биоценозах Беларуси и первичного скринига их энтомоцидной активности для дальнейшего изучения отобраны 3 штамма P.fumoso-roseus — перспективных продуцента микоинсектицидных препаратов. Предполагается проведение дальнейшего изучения их биологических и патогенных свойств с целью разработки оптимальных методов культивирования и применения.

Литература

1. Большой практикум по микробиологии // Т.В.Аристовская., М.Е.Владимирская, М.М.Голлербах и др.; Под ред. Г.Л.Селибера. – Москва: Высш. школа, 1962. – 492 с.

2. Евлахова А.А. Микозы вредных насекомых.: Автореф.... д-ра.биол.наук.: 06.01.11 / ВНИИ защиты растений. – Пушкин, 1969. – 36 с.

3. Евлахова А.А. Энтомопатогенные грибы. – Ленинград: Наука, 1974. – 277 с.

4. Защита тепличных и оранжерейных растений от вредителей: Справочник / С.С.Ижевский, А.К.Ахатов, К.Н.Олейник и др.; Под ред. С.С.Ижевского, А.К.Ахатова. – Москва: KMK Scientific Press Ltd. – 1999. – 399 с.

5. Иващенко И.И. Беспестицидная технология защиты сельскохозяйственных культур от жуков-щелкунов // Производство экологически безопасной продукции растениеводства. Региональные рекомендации. – Пущино, 1996. – Вып. 2. – С. 203-210.

6. Ильичева С.Н., Алешина О.А., Кононова Э.В. и др. О естественной изменчивости гриба Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. // Тез.докл. координационного совещания по микробиологическим препаратам для сельского хозяйства, Москва, 1972. – Москва, 1972. – С. 71-72.

7. Коваль Э.З. Определитель энтомофильных грибов СССР. – Киев: Наук. думка, 1974. – 260 с.

8. Король И.Т. Микробиологическая защита растений: Справочник. – Москва: Колос, 1993. – 79 с.

9. Лаппа Н.В., Гораль С.В., Халев И.Л. Отбор штаммов Beauveria bassiana для разных способов производства биопрепарата // Актуальные проблемы биологической защиты растений: Тез. докл. научн.-практ. конф., Минск, март 1998 г. – Минск, 1998. – С. 74-75.

10. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. – Ленинград: Наука, 1967. – 303 с.

11. Нелен Е.С. Использование перспективных энтомопатогенов для создания искусственной эпизоотии в плодовых насаждениях // Пути дальнейшего совершенствования защиты растений в Белоруссии и республиках Прибалтики: Тез. докл. научн.-произв. конф., Минск, февраль 1979 г. – Минск, 1979. – Ч.II. – С. 87-88.

12. Огарков Б.Н. Вирулентность штаммов гриба Beauveria bassiana (Bals) Vuill // Микробиологические методы защиты растений: Тез. докл.1-й Всесоюзн. научн. конф., Кишинев, октябрь 1976 г. – Кишинев,1976. – С. 112-113.

13. Павлюшин В.А. Научные основы использования энтомопатогенов и микробов-антагонистов в фитосанитарной оптимизации тепличных агробиоценозов: Автореф.... д-ра биол. наук: 06.01.11 / Всеросс. НИИ защиты растений. – С.-Петербург – Пушкин, 1998. – 66 с.

14. Примак Т.А. Методика получения и отбора стабильных штаммов гриба Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. для производства биопрепарата боверина // Биологический метод борьбы с вредителями растений: Сб. ст. / Под ред. Я.П.Циновского – Рига, 1968. – С. 159-163

15. Сосновска Д. Биофизиологические особенности энтомопатогенных грибов рода Aschersonia и Paecilomyces fumoso-roseus в связи с биологической защитой растений от сосущих вредителей (Homoptera: Aleyrodidae, Aphididae).: Автореф.... канд. биол. наук: 06.01.11 / ТСХА – Москва, 1990. – 20 с.

16. Тюльпанова В.А., Тюльпанов В.Г. Сибирские штаммы мускардиновых грибов // Патогенные микроорганизмы вредителей растений: Мат-лы симп., Рига, октябрь 1972 г. – Рига, 1972. – С. 33-35.

17. Янковская Е.Н. Оценка биологической активности мускардинных грибов Paecilomyces fumoso-roseus (Wize) Brown et Smith и Metarrhizium anisopliae Metch. по отношению к вредителям защищенного грунта // Защита растений: Сб. научн. тр. / БелНИИ защиты растений. – Минск, 2000. – Вып. XIX/XXIII. – С. 169-174.

18. Castenieras A., Pena J.E., Duncan R., Osborne L. Potential of Beauveria bassiana and Paecilomyces fumoso-roseus (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a biological control agents of Thrips palmi (Thysanoptera: Thripidae) // Fla. Entomol. – 1996. – Vol.79, № 3. – P. 458-461.

19. Gindin G., Barash I., Raccah B. et al. The potential of some entomopathogenic fungi as biocontrol agents against the onion thrips, Thrips tabaci and the western flower thrips, Frankliniella occidentalis // Folia Entomol. Hung. – 1996. – Vol. 57, Suppl. – P. 37-42.

20. Lindquist R. Microbial control of greenhouse pests using entomopathogenic fungi in USA // IOBC / WPRS Bull. – 1996. – Vol. 19(9). – P. 153-156.

21. Sosnowska D. Possibilities of using the entomopathogenic fungus Paecilomyces fumoso-roseus in glasshouse pest control depending on temperature and humidity // Efektywnosc i praktyczne zastosowanie zwalczania biologicznego w ochronie roslin: Materialy z Sympozjum na temat, Skierniewice, marc 1997 r. –

Skierniewice, 1997. – P. 117-124.

22. Sosnowska D., Piatkowski I. Efficacy of entomopathogenic fungus Paecilomyces fumoso-roseus against whitefly (Trialeurodes vaporariorum) in greenhouse tomato cultures // IOBC / WPRS Bull. – 1996. – Vol. 19(9). – P. 179-182.

23. Vestergaard S, Gillespie A.T., Eilenberg J. Control of western flower thrips Frankliniella occidentalis (Thysanoptera: Thripidae) in gerbera by incorporating the entomopathogenic fungus Metarrhizium anisopliae into the growth medium // IOBC / WPRS Bull. – 1996. – Vol. 19(9). – P. 240-246.

24. Vidal,-C; Lacey,-L.A.; Fargues,-J. Pathogenicity of Paecilomyces fumoso-roseus (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against Bemisia argentifolii (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method // J.Econ.Entomol. – 1997. – Vol. 90, № 3. – P. 765-772.

25. Zimmermann, G. "Galleria bait method" for detection of entomopathogenic fungi in soil // Zeitch.angew.Entomol. – 1986. – № 2. – P. 213-215.