

Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Hyphomycetes)

для регуляции численности насекомых

New approaches to the biological control of insects by entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycota, Hyphomycetes)

В.Ю. Крюков*, Г.Р. Леднёв**, И.М. Дубовский*, В.В. Серебров*,
М.В. Левченко**, В.П. Ходырев*, А.О. Сагитов***, В.В. Глупов*
V.Yu. Kryukov*, G.R. Lednyov**, I.M. Dubovskiy*, V.V. Serebrov*
M.A. Levchenko**, V.P. Khodyrev*, A.O. Sagitov***, V.V. Glupov*

* Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе 11, Новосибирск 630091 Россия. E-mail: kruckoff@mail.ru.

* Institute of Systematics and Ecology of Animals, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Frunze str. 11, Novosibirsk 630091 Russia.

** Всероссийский институт защиты растений РАСХН, шоссе Подбельского 3, Санкт-Петербург, Пушкин 3196608 Россия. E-mail: georgijled@mail.ru.

** All-Russia Institute of Plant Protection RAAS, Podbelskogo shosse 3, Saint Peterburg, Pushkin 196608 Russia.

*** Научно-исследовательский институт защиты растений РК, п. Рахат, Карасайский р-н, Алматинская область 040924 Казахстан.

*** Scientific Research Institute of Plant Protection RK, s. Rakhat, Karasajskiy district, Almaty region 040924 Kazakhstan.

Ключевые слова: микозы насекомых, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, полиморфизм грибов, массовые саранчовые, бактериомикозы, детоксицирующая система, эстеразы.

Key words: mycosis, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, fungi's polymorphism, locusts, resistance system, esterases.

Резюме. Полиморфизм *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill и *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin может быть использован для отбора высокоактивных штаммов. Выявлены свойства колоний грибов, характеризующие вирулентность культур. Установлено, что штаммы, выделенные в сухих стациях, проявляют более высокую активность по сравнению с культурами, взятыми из увлажненных районов. Выяснено, что ксерофильные виды саранчовых более восприимчивы к микозам, чем мезо- и гигрофильные, а стадная форма *Locusta migratoria* L. менее устойчива, чем нестальная. Показана ускоренная гибель саранчовых и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) при экспериментальных микст-инфекциях, сочетающих энтомопатогенные грибы и бактерии *Bacillus thuringiensis* Berliner и *Pseudomonas* sp. Проведено исследование детоксицирующей системы насекомых при развитии грибных патогенов. Зарегистрировано увеличение активности и спектра неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз у большой вошинной моли *Galleria mellonella* (L.) и саранчовых *Calliptamus barbarus* (Costa), *L. migratoria* при заражении *B. bassiana* и *M. anisopliae*. Обсуждаются современные подходы, направленные на подавление механизмов резистентности насекомых.

Abstract. Polymorphism of the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin can be used for the selection of high activity strains. Some characteristics of the fungal colonies, which correlate with virulent abilities, have been detected. It was shown that

fungal strains isolated from dry habitats have higher activity in comparison with strains isolated from moist habitats. Xerophilous species of locusts are less resistant to fungi than hygrophilous ones, and the gregaria phase of *Locusta migratoria* L. is also less resistant to fungi than the solitaria phase. High mortality of locusts and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) infected under laboratory conditions with mixed entomopathogenic fungi and bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner, *Pseudomonas* sp. was determined. The detoxification system of insects has been studied during the pathogenetic development of fungi. Increasing of activity and quantity of isoenzyme of esterases and glutathiontransferases in larvae of the great wax moth *Galleria mellonella* (L.) and locusts *Calliptamus barbarus* (Costa) and *Locusta migratoria* infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* have been detected. New approaches to suppressing the insect resistance system are discussed.

Введение

Энтомопатогенные гифомицеты (Hyphomycetes, Deuteromycota) являются одной из перспективных групп микроорганизмов, используемых для регуляции численности членистоногих. Обычные компоненты микобиоты большинства наземных экосистем, они способны вызывать локальные эпизоотии, ограничивая численность своих хозяев. Представители этой группы хорошо изолируются и культивируются.

вируются на искусственных питательных средах, экономичны в производстве и удобны в применении.

Одними из наиболее распространённых энтомопатогенных гифомицетов являются *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill и *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (вклейка IV: 1). Эти грибы — типичные космополиты, поражающие большой спектр насекомых разных родов, семейств и отрядов. При этом данные виды имеют сложную внутривидовую структуру, представленную целым рядом патовариантов (подвидов), приуроченных к конкретной группе насекомых-хозяев, в отношении которых проявляют максимальную вирулентность, а для других членистоногих являются средне- или слабовирулентными. Так в пределах *Metarhizium anisopliae* в настоящее время выделяют четыре подвида: *M. anisopliae anisopliae* (преимущественно на жуках, космополит); *M. anisopliae majus* (в основном на пластинчатоусых жуках, космополит); *M. anisopliae acridum* (на прямокрылых в Африке и Австралии) и *M. anisopliae lepidiotum* (на термитах и жуках в Австралии) [Humber, 1997].

На основе *B. bassiana* разработан целый ряд биопрепаратов, в том числе российский — Боверин, который применяется в условиях закрытого грунта против трипсов, тлей, алейродид, паутинных клещей, а также в открытом грунте против колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) [Вайзер и др., 1986; Лаппа, Гораль, 1985; Ахатов, Ижевский, 2004; Яркулов и др., 2006]. На основе *M. anisopliae* предложен препарат Метаризин, эффективный в отношении личинок шелкоунов и колорадского жука, а также препараты Green Muscle® (Западная Африка) и Green Guard® (Австралия), широко используемые для регуляции численности массовых саранчовых [Lomer et al., 2001; Lomer, Langewald, 1997].

Применение энтомопатогенных грибов считается вполне эффективным и экологически безопасным методом контроля численности насекомых. Однако широкомасштабное использование микоинсектицидов наталкивается на ряд существенных трудностей.

Во-первых, биологическая активность микомицетов в значительной степени зависит от условий среды. Грибы нуждаются в высокой влажности (более 90 %) для прорастания спор и заражения хозяев, а прямой солнечный свет инактивирует конидии всего за несколько часов [Громовых, 1982; Борисов и др., 2001]. В условиях континентального климата эффективность микоинсектицидов значительно снижается, поэтому необходимо изучение резерва изменчивости энтомопатогенных грибов, поиск штаммов, обладающих высокой активностью в засушливых условиях. Не менее важно исследование восприимчивости к гифомицетам насекомых, населяющих засушливые и увлажнённые местообитания.

Во-вторых, характерной особенностью микозов насекомых является длительный латентный период инфекции. Так, при заражении личинок младших и

средних возрастов колорадского жука гибель наступает преимущественно в стадии предкуколки и куколки (вклейка IV: 2), а у саранчовых массовая смертность обычно наблюдается на 9–15 сутки после инокуляции [Сидура и др., 1979; Lomer et al., 2001; Крюков и др., 2006a, b; Леднёв и др., 2005]. Растянутая во времени гибель может наблюдаться при заражении гифомицетами равнокрылых, клопов, чешуекрылых и многих других групп насекомых [Архипова, 1966; Половинко, Наумова, 1997; Luz et al., 1998; Огарков, Огаркова, 2000; Половинко, 2006]. Естественно, что это обстоятельство ограничивает интерес практиков к грибным препаратам, поскольку за время латентного развития микоза насекомые могут изъять значительную часть фитомассы. Однако существует ряд способов сокращения латентного периода. Весьма перспективным является поиск определённых сочетаний энтомопатогенных грибов и бактерий, которые могут приводить к высокой гибели насекомых в короткие сроки.

В-третьих, насекомые имеют достаточно совершенную систему защиты организма от различных инфекционных заболеваний. В тоже время, энтомопатогенные грибы обладают большим арсеналом ферментов и микотоксинов, участвующих в инфекционном процессе [Митина и др., 1997, 2002; Борисов и др., 2001]. Непосредственно с этим связан тот факт, что одна из ключевых защитных функций насекомых при микозах принадлежит детоксицирующей системе. В частности, такие детоксицирующие ферменты насекомых, как глутатион-S-трансферазы и неспецифические эстеразы принимают активное участие в процессах деградации ксенобитиков при микозах [Серебров и др., 2001]. Эффективная работа детоксицирующей системы насекомых существенно снижает активность микотоксинов и является одним из барьеров при использовании энтомопатогенных грибов. Поэтому один из способов повышения эффективности биопрепаратов на основе гифомицетов может заключаться в подавлении физиолого-биохимических реакций организма насекомых, определяющих их устойчивость к возбудителям инфекций. Несмотря на очевидность данного подхода, исследования в данном направлении практически не проводятся, как и практическое применение иммунодепрессантов при разработке и производстве биопрепаратов на основе энтомопатогенных грибов.

Некоторые принципы отбора высоковирулентных штаммов грибов

При отборе высоковирулентных изолятов энтомопатогенных грибов важная роль отводится признакам, косвенно или напрямую связанным с инсектицидной активностью штаммов. Предпринимаются попытки связать вирулентность с ферментативной активностью, морфо-культуральными свойствами, токсинообразованием [Павлюшин, 1979; Митина и др., 1997, 2002; Гештовт, 2002].

В экспериментах с природными изолятами *B. bassiana* установлена тесная корреляция между морфологией колоний, продуктивностью конидий и вирулентностью. Наиболее продуктивными и вирулентными оказались культуры с низкими нерельефными колониями, тогда как штаммы с морщинистыми и высокими колониями характеризовались низкой продуктивностью, более поздним спороношением, средней или низкой биологической активностью. У первой группы штаммов вирулентность по отношению к саранчовым и колорадскому жуку составила 80–100 %, у второй группы — 0–60 %. Сходная взаимосвязь была установлена Б.Н. Огарковым и Г.Р. Огарковой [2000] и О.А. Алёшиной с соавторами [1972] для *B. bassiana*, а также Г.В. Митиной с соавторами [1997] для *Lecanicillium* sp. Иная ситуация отмечена для морфовариантов *M. anisopliae*, полученных путём моноспоровых расщеплений исходных культур и последующего отбора изолятов. Большей продуктивностью и биологической активностью отличались морфоварианты с более пушистыми колониями, тогда как изоляты с порошистой структурой показали меньшую продуктивность и вирулентность [Serebrov, 2006; Крюков и др., в печати].

Другой аспект поиска высокоактивных штаммов энтомопатогенных грибов — исследование вирулентных свойств изолятов различного происхождения, то есть выделенных в разных природно-климатических зонах из насекомых различных систематических групп.

В результате лабораторного скрининга штаммов гифомицетов, принадлежащих к родам *Metarhizium* и *Beauveria* из коллекции ВИЗР РАСХН, ЗАО «Росагросервис» и ИСиЭЖ СО РАН на перелётной саранче *Locusta migratoria* L. был выявлен ряд закономерностей.

1. Наибольшей вирулентностью в отношении указанного тест-объекта (смертность насекомых на уровне 60–100 %) обладают штаммы, выделенные непосредственно из трупов различных видов саранчовых (табл. 1). Биологическая активность штаммов, изолированных из насекомых других систематических групп (равнокрылые, жуки и др.), была существенно ниже и обычно не превышала 50 %.

2. Штаммы, изолированные непосредственно из саранчовых, также существенно различались по уровню вирулентности в зависимости от зоны выделенности. Наибольшую активность по отношению к саранче (90–100 %) проявляли штаммы *B. bassiana*

Таблица 1. Характеристика штаммов, использованных в скрининге по признаку вирулентности в отношении перелётной саранчи.

Table 1. Description of strains used for screening on the basis of virulence to migratory locust.

Вид гриба	№ штамма	Насекомое-хозяин	Место и год изоляции	Характеристика очага	Гидротермические условия (июнь – август)			Вирулентность на личинках перелётной саранчи, %
					t, °C	Осадки, мм	ГТК	
<i>Beauveria bassiana</i>	ББЧ-99*	Acrididae sp.	Чемальский р-н Республики Алтай, 1999	Единичные особи	18	400	2,4	40-60
	ББК-1*	<i>Calliptamus italicus</i> (L.) (Acrididae)	Карасукский р-н Новосибирской обл., 2000	Локальная энзоотия (15%)	19	130	0,74	90-100
	ББЛ-03*	Acrididae sp.	Лазовский зап-к, Приморский край, 2003	Локальная эпизоотия (80%)	17	380	2,4	40-60
	САР-31**	<i>Calliptamus italicus</i> (L.) (Acrididae)	Карасукский р-н Новосибирской обл., 2001	Единичные экземпляры	19	130	0,74	60-100
	СШ-01**	<i>Dendrolimus superans</i> (Butl.) (Lasiocampidae)	Новосибирск, 2000	-	Лабораторная популяция			30-40
	ББКЖ***	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say) (Chrysomelidae)	Краснодарский край, 1998	Единичные особи	22	160	0,8	30-50
<i>Beauveria brongniartii</i>	БТ-86*	<i>Doclostaurus maroccanus</i> (Thnb.) (Acrididae)	Узбекистан, Кашкадарьинская обл., 1986	Локальная энзоотия (10%)	33	30	0,1	60-100
<i>Metarhizium anisopliae</i>	МАК-1*	<i>Calliptamus italicus</i> (L.) (Acrididae)	Карасукский р-н Новосибирской обл., 2000	Локальная энзоотия (5%)	19	130	0,74	90-100
	Р-72-х**	<i>Tenebrio molitor</i> (L.) (Tenebrionidae)	Новосибирск, 2000	-	Лабораторная популяция			60-100
	МАЛИ***	<i>Agelastica alni</i> (L.) (Chrysomelidae)	Краснодарский край, 1998	Единичные особи	22	160	0,8	30-50

* — коллекция ВИЗР (С.-Петербург); ** — ИСиЭЖ СО РАН (Новосибирск); *** — ОАО «Росагросервис» (Москва).

(ББК-1) и *M. anisopliae* (МАК-1), выделенные из типично ксерофитных стадий — сухих степей (Карасукский район Новосибирской области), где гидротермический коэффициент (ГТК) вегетационного периода не превышает 1 (табл. 1). Вирулентность штаммов, изолированных во влажных районах, с ГТК выше 2 (юг Приморья, предгорья Алтая) была значительно ниже (60–80 %).

При этом уровень естественной заражённости насекомых микозами в местах их сбора не оказывал существенного влияния на их биологическую активность в отношении перелётной саранчи. Так, наиболее активные штаммы ББК-1 и МАК-1 были изолированы в период локальной энзоотии в популяции *Calliptamus italicus* (L.) (заражённость не превышала 15 и 4,8 % соответственно). В тоже время, штамм ББЛ-03, выделенный из очага эпизоотии на юге Приморского края (естественная заражённость нестадных саранчовых — более 80 %), проявил среднюю вирулентность (до 60 %).

Таким образом, полиморфизм исследуемых грибов может являться значительным резервом для повышения эффективности микоинсектицидных препаратов, а выявленные особенности могут служить для отбора высокоактивных культур.

Восприимчивость разных видов и внутривидовых форм саранчовых к энтомопатогенным гифомицетам

Различия в чувствительности разных видов саранчовых к энтомопатогенным грибам обнаружены в сериях параллельно поставленных экспериментов. Оценка биологической активности штаммов была проведена на лабораторных популяциях перелётной саранчи *L. migratoria migratorioides* (R. et F.), пустынной саранчи *Schistocerca gregaria* (Forsk.), природных популяциях азиатской саранчи *L. migratoria migratoria* L., кобылки Вагнера *Mioscirtus wagneri* (Ev.) и зелёной болотной кобылки *Mecostethus alliaceus* (Germ.) в Астраханской области; азиатской саранчи, пустынного пруса *Calliptamus barbarus* (Costa) и комплекса видов трибы Dociostaurini в Алматинской области.

В ходе экспериментов была выявлена следующая тенденция. Ксерофильные виды (пустынная саранча, пустынный прус, кобылка Вагнера, комплекс Dociostaurini) оказались менее устойчивыми к грибным патогенам, чем мезо- и гигрофильные виды (перелётная саранча, болотная кобылка). Так, при низких титрах суспензии *M. anisopliae* ($5 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ конидий/мл) у личинок II–III-го возраста *C. barbarus* и Dociostaurini на 7–9 сутки эксперимента наблюдалась 100 % гибель. У *L. migratoria* при тех же условиях отмечена лишь 50–60 % смертность. При инфицировании имаго пустынного пруса и личинок старших возрастов перелётной саранчи грибом *M. anisopliae* 100 % гибель *C. barbarus* наблюдается уже через 5–8 дней, тогда как 100 % гибель *L. migratoria* — только через 17 суток (табл. 2).

Таблица 2. Срок наступления 100 % смертности имаго пустынного пруса и личинок V возраста перелётной саранчи, инфицированных *M. anisopliae* (МАК-1) и *B. bassiana* (ББК-1).

Table 2. Time of 100 % mortality of *C. barbarus* imago and *L. migratoria* V-instar nymphs infected with *M. anisopliae* (МАК-1) and *B. bassiana* (ББК-1).

Вариант	Титр	LT ₁₀₀ , сутки	
		<i>C. barbarus</i>	<i>L. migratoria</i>
МАК-1	1×10^7	8	17
	5×10^7	5	17
ББК-1	1×10^7	5	11
	5×10^7	5	7

Эксперимент на имаго кобылки Вагнера показал, что активность трёх видов гифомицетов (*M. anisopliae*, *B. bassiana* и *B. brongniartii* (Sacc.) Petch) при титрах $1 \cdot 10^7$ и $5 \cdot 10^7$ уже на 1 сутки после обработки превышала 50 %, а через 11 дней уровень смертности составлял 95–100 %. Параллельно проведённый опыт на имаго болотной кобылки показал, что смертность хозяина к 11 суткам была существенно ниже по сравнению с кобылкой Вагнера (55–65 %). Сходные данные получены при инфицировании тремя видами энтомопатогенных грибов личинок *L. migratoria* и *S. gregaria* (рис. 1).

Вероятно, причина этого явления заключается в различиях мест обитания указанных видов саранчовых и, соответственно, их гидротермических преферендумов. Так, перелётная саранча заселяет тростниковые заросли вдоль оросительных каналов и рек, а зелёная болотная кобылка занимает луговые стадии с густой растительностью на пониженных частях рельефа. Температурный оптимум этих видов находится в пределах 26–28 °С [Цыпленков, 1972]. Подобные условия вполне благоприятны для развития энтомопатогенных грибов и, следовательно, высока вероятность контакта патогена и хозяина.

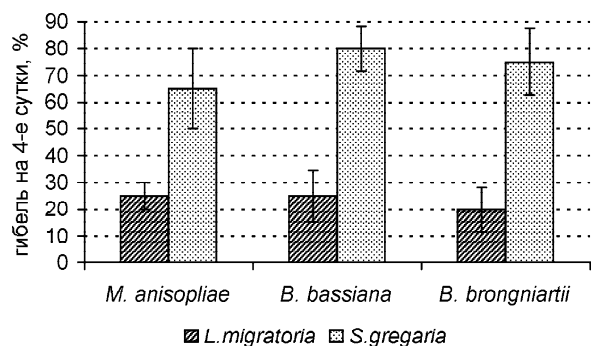


Рис. 1. Смертность личинок I возраста перелётной и пустынной саранчи при заражении *M. anisopliae* (МАК-1), *B. bassiana* (ББК-1) и *B. brongniartii* (БТ-86) (титр $5 \cdot 10^7$ конидий/мл, гибель в контроле — 0 %).

Fig. 1. The mortality of I-instar nymphs of *L. migratoria* and *S. gregaria* infected with *M. anisopliae* (МАК-1), *B. bassiana* (ББК-1) and *B. brongniartii* (БТ-86) ($5 \cdot 10^7$ conidia/ml, the mortality in the control — 0 %).

При таких обстоятельствах постоянного сосуществования можно предположить наличие у насекомого-хозяина дополнительных защитных реакций к патогенным микромицетам.

Напротив, пустынная саранча, кобылка Вагнера, пустынный прус, виды трибы *Dociostaurini* занимают в основном ксерофитные станции (степи, полупустыни и пустыни), температурный оптимум у них несколько выше — 28–30 °С [Цыпленков, 1972]. Подобный гидротермический режим явно неблагоприятен для возбудителей микозов. При этих условиях возможность контакта между паразитом и хозяином сильно ограничена, и как следствие этого, вероятно недостаточное формирование механизмов защиты у саранчовых к энтомопатогенным грибам. Это в итоге и обеспечивает более высокую чувствительность насекомых к микозам.

В то же время, при использовании химических инсектицидов отмечена обратная ситуация. Так, по данным В.В. Курдюкова и О.Н. Наумовича [1984], чувствительность перелётной саранчи к гексахлорциклогексану (ГХЦГ) была существенно выше в сравнении с такими ксерофитными видами, как марокканская саранча *Dociostaurus maroccanus* (Thnb.), итальянский и пустынный прусы. Этими же авторами приводятся сведения о том, что LD_{50} ГХЦГ и хлорофоса для итальянского пруса в 1,5–2 раза выше по сравнению с более гигрофильными видами, такими как сибирская и крестовая кобылки *Aeropus sibiricus* (L.) и *Arciptera microptera* (F.d.W.). Аналогичные данные приведены в работе Мак-Квига [MacCuaig, 1956].

Анализируя приведённые факты, вышеупомянутые авторы связывают это явление прежде всего с различиями в толщине кутикулы ксеро- и гигрофильных видов. У первых толщина покровов тела значительно больше по сравнению со вторыми. В связи с этим, проницаемость кутикулы для контактных инсектицидов у гигрофильных видов выше, чем у ксерофильных.

Руководствуясь приведёнными выше данными, логично было бы предположить аналогичную картину и в отношении энтомопатогенных микромицетов, основным способом проникновения кото-

рых в организм хозяина является перкутанный [Евлахова, 1974]. Тем не менее, результаты экспериментов носят диаметрально противоположный характер.

Различия в восприимчивости насекомых к грибам установлены не только для разных видов саранчовых, но и для внутривидовых форм. Выяснено, что стадная фаза перелётной саранчи менее устойчива к исследуемым патогенам, чем нестадная. При инфицировании *M. anisopliae* различия в гибели между фазами сохраняются в течение 9 суток на уровне 20–30 % (табл. 3). В дальнейшем эти различия нивелируются и смертность на 15 сутки эксперимента достигает 90–100 %. Анализ данных серии опытов, в которых соотношения фаз соответствовало наблюдаемому в природе (стадные — 35 %, нестадные — 55 %), выявил ту же закономерность. Вероятно, данная ситуация связана с отличиями в жизненных стратегиях указанных форм. Нестадная фаза ближе к к-стратегам, и обладает по сравнению со стадной фазой меньшей плодовитостью, большей продолжительностью развития и повышенной устойчивостью к стрессовым факторам, в частности к патогенам. Напротив, стадная фаза перелётной саранчи по своим биологическим свойствам ближе к г-стратегам и имеет более высокую плодовитость, сокращённый период развития, а также менее устойчива к различным поражающим факторам.

Смешанные бактериально-грибные инфекции насекомых

Как отмечалось выше, особенностью микозов насекомых, вызванных гифомицетами, является длительный латентный период инфекции. Сокращения этого периода, а также повышения общей инсектицидной эффективности можно добиться при использовании химических агентов [Серебров и др., 2005; Furlong, Groden, 2001; Tian, Feng, 2006], а также смеси энтомопатогенов близкого или отдалённого систематического положения [Bajan, 1973; Логинов, Павлюшин, 1987; Wraight, Ramos, 2005]. Установлено, что под действием ряда бактерий и

Таблица 3. Влияние фазовой изменчивости личинок V возраста перелётной саранчи на биологическую активность гриба *M. anisopliae* (штамм МАК-1).

Table 3. Influence of phase variability of migratory locust V-instar nymphs on biological activity of *M. anisopliae* (strain МАК-1).

Вариант	Фаза хозяина	Смертность, % (сутки)							
		3	5	7	9	11	13	15	17
1x10 ⁷	стадные	28,0±10,2	36,0±13,3	44,0±13,3	64,0±7,5	80,0±10,9	88,0±8,0	100	100
	нестадные	8,0±8,0	16,0±16,0	16,0±16	28,0±13,6	68,0±10,2	88,0±4,9	92,0±4,9	96,0±4,0
5x10 ⁷	стадные	16,0±7,5	28,0±8,0	52,0±13,6	92,0±4,8	100	100	100	100
	нестадные	8,0±4,9	16,0±9,8	36,0±7,5	72,0±12,0	96,0±4,0	100	100	100
Контроль	стадные	0	8,0±4,9	20,0±8,9	20,0±8,9	20,0±8,9	20,0±8,9	32,0±13,6	32,0±13,6
	нестадные	0	4,0±4,0	8,0±8,0	8,0±8,0	12,0±8	16,0±7,5	20,0±8,9	20,0±8,9
HCP ₀₅		18,8	16,1	19,8	28,0	23,4	17,8	20,2	19,9

бактериальных препаратов у насекомых может ухудшаться питание, замедляться рост и значительно удлиняться межличиночный период. Задержка роста и линьки должна благоприятствовать проникновению гифальных тел гриба в кутикулу и гемоцель и приводить к быстрой гибели насекомых.

В ходе исследований, направленных на поиск штаммов энтомопатогенных грибов и бактерий, высоковирулентных по отношению к массовым саранчовым и колорадскому жуку, были выявлены сочетания бактерий и дейтеромицетов, вызывающие высокую гибель насекомых в относительно короткий промежуток времени. Первоначально установлено, что неспоровая бактерия *Pseudomonas* sp., выделенная из погибших особей двупятнистого японского сверчка (*Gryllus bimaculatus* Deg.), проявляет патогенные свойства по отношению к представителям отряда прямокрылых, при этом авирулентна для чешуекрылых и жуков. В экспериментах по инфицированию различных саранчовых (*L. migratoria*, *C. barbarus*, комплекс *Dociostaurini*) бактерия вызывала 40–90 % гибель в зависимости от возраста личинок и инфекционной нагрузки ($5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^7$ клеток/мл). При этом массовая смертность наблюдалась в первые 3–6 суток после инфицирования, затем кривая гибели выходила на плато и 100 % смертности никогда не отмечалось (рис. 2). Напротив, гифомицеты начинали действовать на 5–7 сутки, а на 8–17 сутки приводили к 100 % гибели саранчовых. При синхронном заражении грибом (*M. anisopliae* или *B. bassiana*) и бактерией наблюдалась наиболее ранняя и полная гибель личинок. Кривая смертности в первые 5–6 суток имела характер бактериоза, а последующих суток — микоза. Серия опытов по подбору концентраций патогенов показала, что оптимальными титрами гриба и бактерии являются $1 \cdot 10^7$ и $5 \cdot 10^6$, соответственно. При повышении титра одного из патогенов (или обоих патогенов) различия в динамике гибели при бактериомикозе и при монозаражении могут нивелироваться. При снижении титра гриба или бактерии аддитивный эффект оказывается менее выраженным. Изучение антагонизма *Pseudomonas* и дейтеромицетов на искусственных средах методом блоков показало, что исследуемые грибы не влияют на рост бактерий, а *Pseudomonas* умеренно подавляет рост грибов. Микробиологический анализ особей, погибших от бактериомикозов, показал, что в трупах могут совместно существовать оба микроорганизма.

Сходные данные были получены при обработке колорадского жука смесью, содержащей конидии грибов (*B. bassiana* или *M. anisopliae*) и спорокситаллический комплекс *Bacillus thuringiensis* Berliner (1 или 8 серотипы). Бактерии вызывали невысокую гибель личинок (до 60 %), однако, при этом отмечалась слабая повреждаемость листьев и замедленный по сравнению с контролем рост личинок. Совместная обработка бациллой и грибом приводила к ускорению гибели личинок, т.е. к уменьшению

показателя Lt (рис. 3). Наиболее выраженный аддитивный эффект наблюдался при использовании малых титров грибов ($1 \cdot 10^6$ конидий/мл). Исследование взаимодействия гифомицетов и упомянутых бактерий методом блоков выявило отсутствие антагонизма между *B. bassiana* и обоими серотипами *B. thuringiensis* и незначительное угнетение роста бацилл грибом *M. anisopliae*.

Рассмотренные выше сочетания патогенов могут являться весьма перспективными в создании

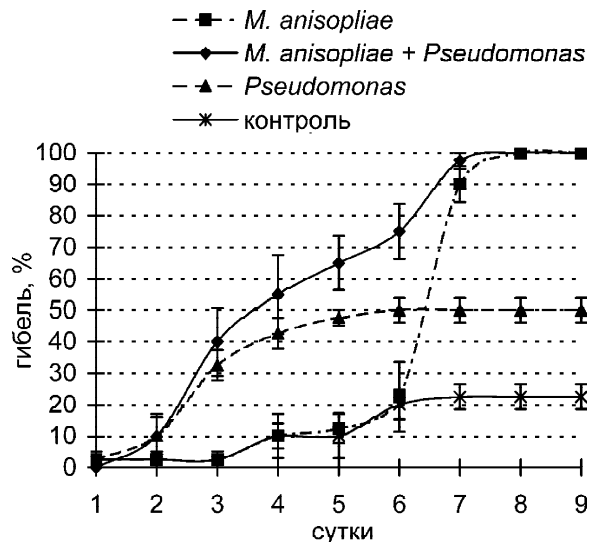


Рис. 2. Динамика смертности личинок II–III возраста *C. barbarus* при инфицировании *M. anisopliae* ($1 \cdot 10^7$ конидий/мл) и *Pseudomonas* sp. ($5 \cdot 10^6$ клеток/мл).

Fig. 2. Dynamics of mortality of *C. barbarus* II–III-instar nymphs infected with *M. anisopliae* ($1 \cdot 10^7$ conidia/ml) and *Pseudomonas* sp. ($5 \cdot 10^6$ cells/ml).

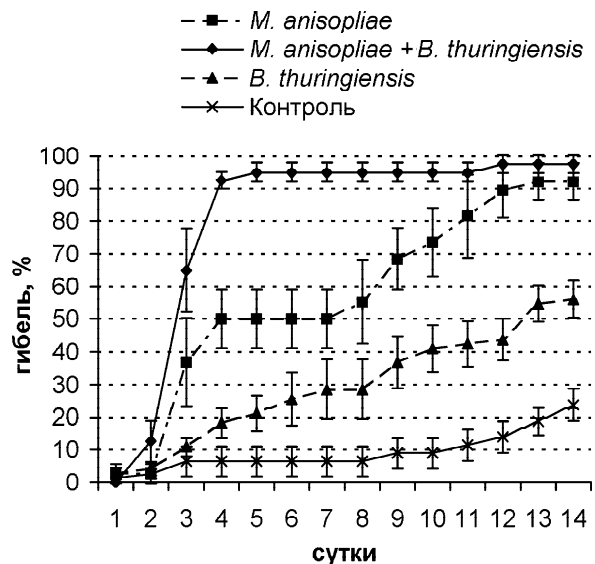


Рис. 3. Динамика смертности *L. decemlineata* при инфицировании личинок II возраста *M. anisopliae* (титр — $5 \cdot 10^6$ конидий/мл) и *B. thuringiensis tenebrionis* (титр — $5 \cdot 10^7$ спор/мл).

Fig. 3. Dynamics of mortality of *L. decemlineata* II-instar larvae infected with *M. anisopliae* ($5 \cdot 10^6$ conidia/ml) and *B. thuringiensis tenebrionis* ($5 \cdot 10^7$ spores/ml).

комплексных препаратов для снижения численности саранчовых и колорадского жука.

Пути снижения устойчивости насекомых к энтомопатогенным грибам

Поиск и использование различных средств и приёмов, снижающих устойчивость насекомых к возбудителям микозов, давно привлекали внимание исследователей. Эмпирическим путём было обнаружено, что эффективность препаратов на основе энтомопатогенных грибов может быть существенно увеличена при совместном их использовании с химическими инсектицидами [Бенц, 1976; Delgado et al., 1999]. Но перспективы совместного использования грибов и инсектицидов не получили дальнейшего развития. С одной стороны, это было обусловлено появлением высокоэффективных и низкотоксичных инсектицидов на основе синтетических пиретроидов, что резко снизило интерес к биологическим средствам контроля насекомых, с другой — с недостаточной изученностью микозов и механизмов синергизма. Очевидно, что для дальнейшего развития данного направления необходимы фундаментальные исследования.

При изучении механизмов резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам было показано, что существенную роль играют механизмы, направленные на детоксикацию продуктов метаболизма патогенов [Серебров и др., 2001, 2003, 2006; Serebrov et al., 2005]. Это связано с тем, что энтомопатогенные грибы обладают большим арсеналом метаболитов, участвующих в инфекционном процессе, и отличительной чертой микозов является интоксикация организма насекомых [Samuels et al., 1988; Krasnoff et al., 1988; Vey et al., 1993; Hajek, Leger, 1994; James et al., 1994; Vilcinskas et al., 1999]. Однако механизмы детоксикации микотоксинов в организме насекомых остаются практически неизученными. В своей работе мы опирались на исследования по изучению механизмов резистентности насекомых к химическим инсекти-

цидам, в которых было показано, что деградация и детоксикация инсектицидов является одним из важнейших механизмов резистентности. В большинстве случаев деградация инсектицидов в организме насекомых происходит в результате ферментативных реакций, которые направлены на повышение реакционной способности и гидрофильности токсинов и протекают, как правило, по каскадному принципу. Сначала вещества подвергаются при участии оксиредуктаз и гидролаз окислению, восстановлению и/или частичному разрушению. В результате формируются более реакционноспособные промежуточные соединения. Такие соединения становятся субстратами для различных трансфераз, которые, в свою очередь, катализируют конъюгацию ксенобиотиков с глутатионом, аминокислотами, сахарами, образуют сульфаты и т.д. В результате данных реакций образуются соединения, хорошо растворимые в воде, и соответственно, легко выводимые из организма насекомых с экскрементами. Для большинства химических инсектицидов, растительных токсинов и других ксенобиотиков было показано, что их деградация и детоксикация в организме насекомых протекает при участии микросомальных монооксигеназ, глутатион-S-трансфераз и гидролаз с различной субстратной специфичностью, часто объединяемых в группу детоксицирующих ферментов [Амирханов, Соколянская, 1992; Баканова и др., 1992, 1996; Ishaaya, 1993; Рославцева, 1994; Feyerisen, 1999].

Участие детоксицирующих ферментов при микозах было впервые показано в модельных экспериментах с гусеницами пчелиной огнёвки *Galleria mellonella* (L.). В ходе работы было установлено, что инфицирование насекомых энтомопатогенными грибами сопровождается резким увеличением активности неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз в гемолимфе (рис. 4). Кроме того, повышение активности неспецифических эстераз происходит за счёт индукции дополнительных изоферментов [Серебров и др., 2001]. Было установлено, что основным фактором, приводящим к повы-

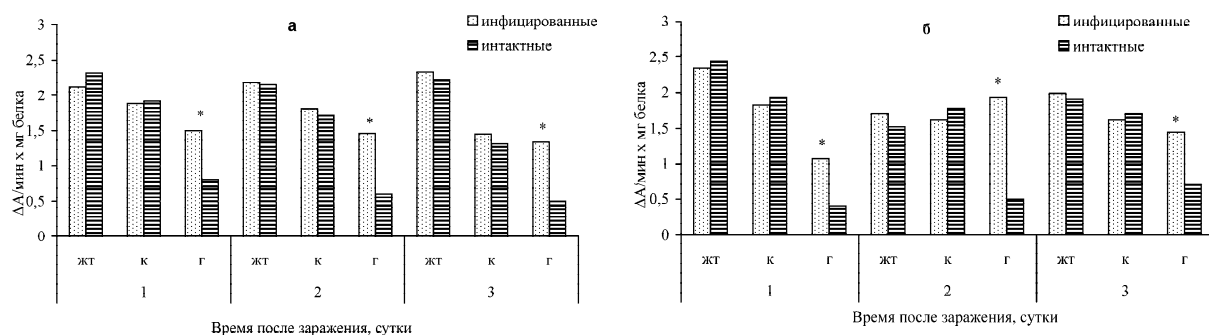


Рис. 4. Изменение активности неспецифических эстераз (а) и глутатион-S-трансферазной активности (б) в гемолимфе (г), гомогенатах жирового тела (жт) и кишечника (к) гусениц пчелиной огнёвки при инфицировании грибом *M. anisopliae* (* $p < 0,01$ по сравнению с интактными).

Fig. 4. The esterases (a) and glutathione transferases (б) activity in hemolymph (г), fat body (жт) and midgut (к) larvae of wax moths infected with *M. anisopliae* (* $p < 0,01$).

шению активности детоксицирующих ферментов при микозах, является механическое повреждение тканей кутикулы насекомых гифами грибов при их проникновении в организм хозяина [Серебров и др., 2001, 2006]. Схожие тенденции были зарегистрированы при изучении спектра и активности неспецифических эстераз у личинок пустынного пруса и азиатской саранчи в начальный (3 сутки после заражения) и «острый» (5, 6 сутки после заражения) периоды. Так, на начальных этапах инфекции, вызванной *B. bassiana* и *M. anisopliae* у личинок саранчовых было отмечено увеличение активности неспецифических эстераз в гомогенате общего тела. При этом не было зарегистрировано изменений в спектре изоформ эстераз. Напротив, в «острый» период микоза отмечено достоверное снижение активности эстераз у личинок обоих видов саранчовых (рис. 5).

Повышение активности детоксицирующих ферментов у насекомых при инфицировании различными патогенами было описано ранее [Kucera, 1978; Sujak, 1978; Андросов, Алиева, 1980; Кольчевская, Кольчевский, 1988]. Однако исследователи не связывали данные физиолого-биохимические реакции с процессами детоксикации. Мы предполагаем, что повышение активности детоксицирующих ферментов — это защитная реакция организма насекомого-хозяина, направленная на детоксикацию продуктов метаболизма грибов. Так, у насекомых на начальных стадиях инфицирования энтомопатогенными грибами было отмечено повышение устойчивости к химическим инсектицидам, что свидетельствует об общем повышении интенсивности детоксикационных процессов при микозах. Кроме того, при обработке насекомых селективными ингибиторами неспецифических эстераз, глутатион-S-трансфераз и цитохром P450 зависимых монооксигеназ было обнаружено резкое увеличение чувствительности к энтомопатогенным грибам [Серебров и др., 2006]. Это может быть косвенным подтверждением участия детоксицирующих ферментов в формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам.

Роль детоксицирующих ферментов в формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам необходимо учитывать при разработке новых биопрепаратов на основе гифомицетов, стратегии и тактики их применения в регуляции численности насекомых. В частности, для увеличения эффективности биопрепаратов было предложено вводить в их состав ингибиторы детоксицирующих ферментов. Эффективность подобного подхода была продемонстрирована в лабораторных и полевых экспериментах на различных видах насекомых: большой пчелиной огнёвке (рис. 6), непарном шелкопряде *Lymantria dispar* (L.), черёмуховой моли *Yponomeuta evonymellus* (L.) и итальянском прусе [Серебров, 2000]. По эффективности биопрепараты на основе энтомопатогенных грибов и ингибиторов детоксицирующих ферментов практически не

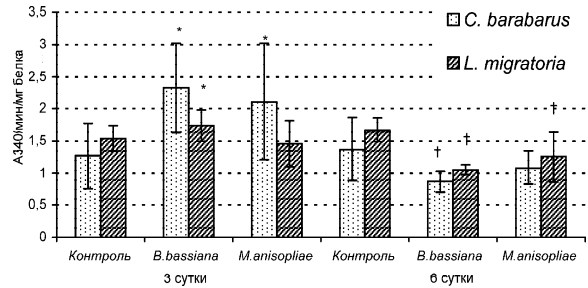


Рис. 5. Активность неспецифических эстераз в гомогенатах целого тела личинок пустынного пруса *C. barbarus* и личинок азиатской саранчи *L. migratoria* при развитии грибной инфекции *M. anisopliae* и *B. bassiana* (*, † $p < 0,01$ по сравнению с контролем).

Fig. 5. The esterases activity in whole body homogenates of the *C. barbarus* and *L. migratoria* nymphs infected with *M. anisopliae* and *B. bassiana* (*, † $p < 0,01$).

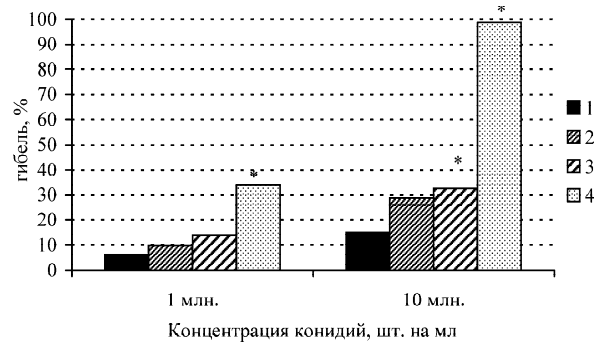


Рис. 6. Влияние ингибиторов детоксицирующих ферментов на гибель гусениц пчелиной огнёвки при инфицировании грибом *M. anisopliae*. 1 — контроль, 2 — диэтилмалеат, 3 — пиперонилбутоксид, 4 — S,S,S-трибутилтрифосфат (* $p < 0,01$ по сравнению с контролем).

Fig. 6. The mortality of wax moths larvae infected with *M. anisopliae* under effect of insect's detoxication system inhibitors 1 — control, 2 — diethylmaleate, 3 — piperonylbutoxide, 4 — S,S,S-tributyltrithiophosphate (* $p < 0,01$).

уступают традиционным смесям энтомопатогенных грибов с химическими инсектицидами, но отличаются от последних меньшей экологической опасностью. С учётом данных по участию детоксицирующих ферментов при формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам также может быть существенно скорректирована стратегия и тактика применения микоинсектицидов в управлении численностью популяций насекомых. Целесообразным является совместное применение грибных препаратов с добавлением сниженных в десятки и сотни раз доз химических инсектицидов или более безопасных ингибиторов детоксицирующих ферментов.

В целом, для развития подобных технологий и успешного широкомасштабного использования энтомопатогенных грибов необходимы детальные исследования не только детоксицирующей системы насекомых, но и ряда физиологических систем, обуславливающих резистентность. В частности, необходимы поиск и разработка химических соединений, не обладающих инсектицидной активностью, но направленных на подавление механизмов резистентности насекомых.

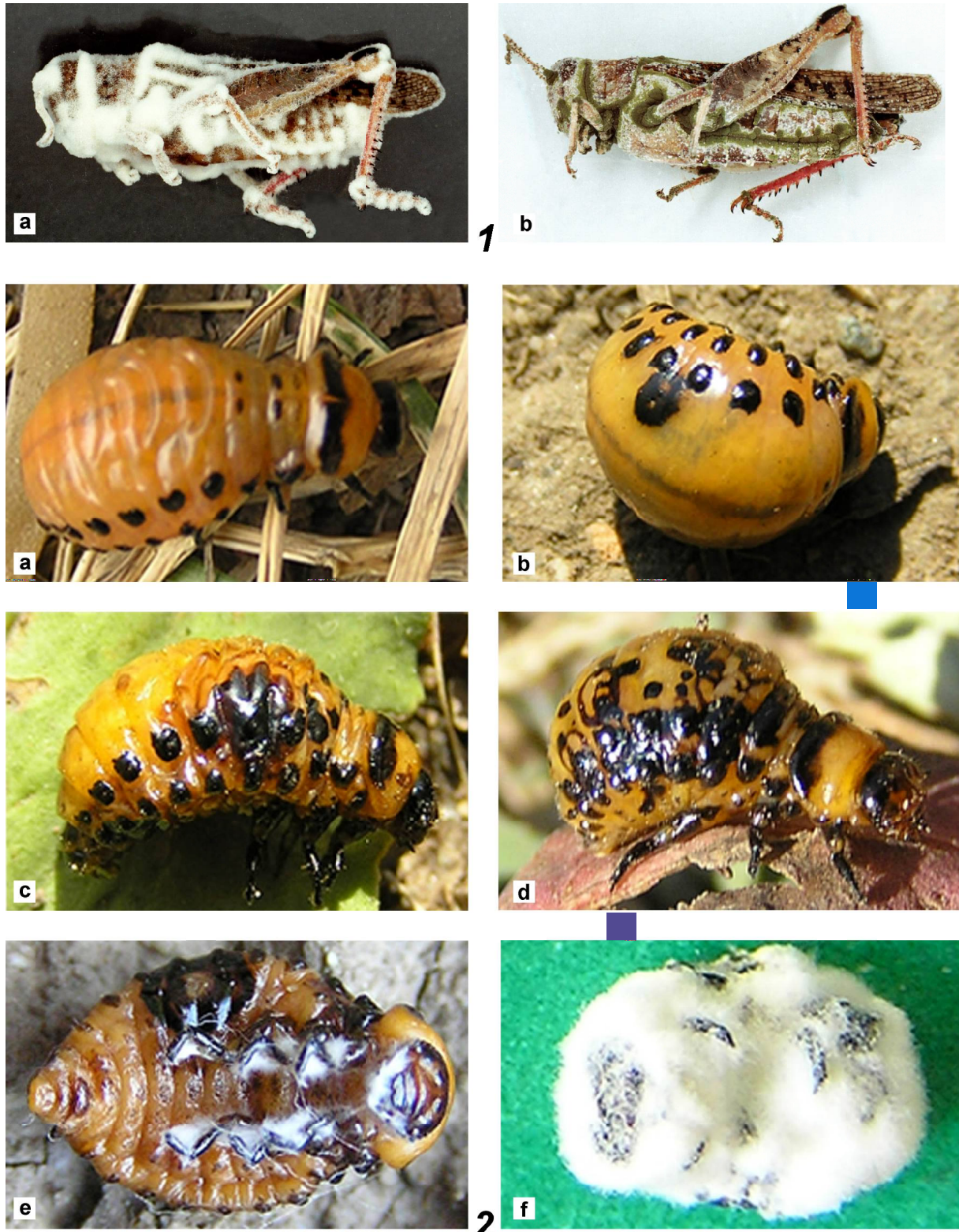
Благодарности

Работа поддержана грантами: НШ - 1038. 2006. 4., «Фонд содействия отечественной науке», Интеграция СО РАН (грант № 100).

Литература

- Алёшина О.А., Ильичёва С.Н., Кононова Э.В., Коляда Н.А. 1972. Основные критерии для отбора штаммов гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. для производственных целей // Микология и фитопатология. Т.6. Вып.4. С.341–344.
- Амирханов Д.В., Соколянская М.П. 1992. Активность ферментов детоксикации на начальной стадии формирования резистентности к инсектицидам у комнатной мухи // Агрехимия. No.10. С.115–121.
- Андросов Г.К., Алиева М.И. 1980. Защитные реакции гемолимфы насекомых при микотоксикозах // Журнал общей биологии. Т.41. No.5. С.726–733.
- Архипова В.Д. 1965. Грибные болезни яблонной плодовой гнили *Garposcarsa pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae) // Энтомологическое обозрение. Т.44. Вып.1. С.89–99.
- Ахатов А.К., Ижевский С.С. 2004. Защита тепличных и оранжерейных растений от вредителей. М. 307 с.
- Баканова Е.И., Ерёмкина О.Ю., Кутузова Н.М., Рославцева С.А. 1992. Свойства и функции глутатион-S-трансферазы членистоногих // Известия РАН. Сер. биологическая. No.4. С.537–545.
- Баканова Е.И., Ерёмкина О.Ю., Рославцева С.А. 1996. Роль микросомальных монооксигеназ насекомых в деградации инсектицидов // Агрехимия. No.10. С.145–154.
- Бенц Г. 1976. Синергизм микроорганизмов и химических инсектицидов // Гиляров М.С. (ред.): Микроорганизмы в борьбе с вредными насекомыми и клещами. М.: Колос. С.105–123.
- Борисов Б.А., Серебров В.В., Новикова И.И., Бойкова И.В. 2001. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты // Глулов В.В. (ред.): Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год. С.352–427.
- Вайзер Я., Виденова Е., Кандыбин Н.В., Смирнов О.В. 1986. Техническая характеристика и стандартизация микробных энтомоцидных препаратов // Информационный бюллетень ВПС МОББ. No.16. С.44–59.
- Гештовт Н.Ю. 2002. Энтомопатогенные грибы (биотехнологические аспекты). Алматы. 288 с.
- Громовых Т.И. 1982. Энтомопатогенные грибы в защите леса. Новосибирск: Наука. 80 с.
- Евлахова А.А. 1974. Энтомопатогенные грибы. Систематика, биология, практическое значение. Л.: Наука. 240 с.
- Кольчевская Е.Н., Кольчевский А.Г. 1988. Анализ множественных форм неспецифических эстераз гусениц капустной сошки, заражённых микроспоридиями *Vairimorpha antheraeae* // Бюллетень ВИЗР. Л. No.71. С.18–21.
- Крюков В.Ю., Леднёв Г.Р., Ходырев В.П., Левченко М.А., Дуйсембеков Б.А., Сагитов А.О., Глулов В.В. 2006а. Влияние энтомопатогенных грибов (*Metarhizium anisoplae*, *Beauveria bassiana*) и бактерии *Pseudomonas* sp. на перелётную саранчу // Энтомологические исследования в северной Азии. VII Межрегиональное совещание энтомологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск. С.353–354.
- Крюков В.Ю., Капжасаров Б.К., Мухамедиев Н.С., Орынбаева А.К., Ходырев В.П. 2006б. Особенности течения микозов у колорадского жука при экспериментальном заражении *Beauveria bassiana* и *Metarhizium anisoplae* в условиях Юго-Восточного Казахстана // Энтомологические исследования в Северной Азии. VII Межрегиональное совещание энтомологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск. С.355–357.
- Крюков В.Ю., Серебров В.В., Малярчук А.А., Копжасаров Б.К., Мухамедиев Н.С., Орынбаева А.К., Ходырев В.П. 2007. Перспективы использования энтомопатогенных гифомицетов (*Deuteromycota*, *Nyphomycetes*) против колорадского жука в условиях Юго-Восточного Казахстана // Сибирский вестник сельхознауки (в печати).
- Курдюков В.В., Наумович О.Н. 1984. Видовая и межвидовая изменчивость чувствительности саранчовых к инсектицидам // Бюллетень ВНИИ защиты растений. No.58. С.7–12.
- Лапа Н.В., Гораль В.М. 1985. Применение боверина для защиты растений в СССР // Информационный Бюллетень ВПС МОББ. No.12. С.47–51.
- Леднёв Г.Р., Левченко М.В., Токарев Ю.С., Крюков В.Ю., Павлюшин В.А., Глулов В.В., Горбунов А.К., Сагитов А.О. 2005. Перспективы использования энтомопатогенных гифомицетов для подавления численности вредных саранчовых // Второй Всероссийский съезд по защите растений. Санкт-Петербург, 5–10 декабря 2005. Фитосанитарное оздоровление экосистем. Материалы съезда. Т.2. С.75–77.
- Логинов Е.В., Павлюшин В.А. 1987. Типы синергизма при бактериально-грибной смешанной инфекции личинок большой пчелиной огнёвки // Интегрированная защита растений от вредителей. Новосибирск. С.123–134.
- Митина Г.В., Сергеев Г.Е., Павлюшин В.А. 1997. Влияние химических и морфолого-культуральных особенностей природных изолятов *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas на вирулентность в отношении личинок оранжерейной белокрылки // Микология и фитопатология. Т.31. Вып.1. С.57–64.
- Митина Г.В., Соколенко С.В., Павлюшин В.А. 2002. Токсины энтомопатогенных грибов // Информационный Бюллетень ВПС МОББ. No.33. С.96–101.
- Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р. 2000. Энтомопатогенные грибы Восточной Сибири. Иркутск: Изд-во Иркутского ун-та. 134 с.
- Павлюшин В.А. 1979. Факторы вирулентности гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. и патогенез мускардиноза насекомых // Автореф. дисс. канд. биол. наук. Л. 24 с.
- Половинко Г.П. 2006. Инсектицидные свойства изолятов гриба *Tolytocladium inflatum* W. Gams, выделенного из лугового мотылька (*Loxostege sticticalis* L.) в Новосибирской области // Биологические науки Казахстана. No.1–2. С.6–17.
- Половинко Г.П., Наумова Е.Н. 1997. Энтомопатогенные свойства гриба *Tolytocladium inflatum* (Gams), выделенного из лугового мотылька *Loxostege sticticalis* L. // Регуляция численности беспозвоночных и фитопатогенов. Новосибирск: НГАУ. С.42–46.
- Рославцева С.А. 1994. Современные воззрения на биохимические механизмы резистентности // Агрехимия. No.10. С.143–148.
- Серебров В.В. 2000. Детоксицирующие ферменты насекомых при микозах: Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, ИСи-ЭЖ СО РАН. 123 с.
- Серебров В.В., Алексеев А.А., Глулов В.В. 2001. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц вошинной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera; Pyralidae) при микозах // Известия РАН. Серия биологическая. Т.28. No.5. С.588–592.
- Серебров В.В., Гербер О.Н., Малярчук А.А., Мартемьянов В.В., Алексеев А.А., Глулов В.В. 2006. Влияние энтомопатогенных грибов на активность детоксицирующих ферментов гусениц пчелиной огнёвки, *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae), и роль детоксицирующих ферментов при формировании резистентности насекомых к энтомопатогенным грибам // Известия РАН. Серия биологическая. No.6. С.581–586.
- Серебров В.В., Киселёв А.А., Глулов В.В. 2003. Изучение некоторых факторов синергизма между энтомопатогенными грибами и химическими инсектицидами // Микология и фитопатология. Т.1. Вып. 37. С.76–82.
- Серебров В.В., Ходырев В.П., Гербер О.Н., Цветкова В.П. 2005. Перспективы использования энтомопатогенных грибов и химических инсектицидов против колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) // Микология и фитопатология. Т.39. Вып.3. С.89–98.
- Сикюра А.И., Ижевский С.С., Трофимова И.Л. 1979. Микробиологические средства борьбы с колорадским жуком. М. 52 с.
- Цыпленков Е.П. 1970. Вредные саранчовые насекомые в СССР. М.: Колос. 174 с.
- Яркулов Ф.Я., Белякова Н.А., Леднёв Г.Р., Новикова И.И., Павлюшин В.А. 2006. Экологические основы биологической

- защиты овощных культур в теплицах Приморского края. Санкт-Петербург–Владивосток. 184 с.
- Bajan C. 1973. Changes in the pathogenicity of the entomopathogenic fungi under the influence of the method of culture and infection // *Ekol. Pol.* Vol.21. No.46. P.715–729.
- Delgado F.X., Britton J.H., Onsager J.A. et al. 1999. Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with diflurbenzuron for control of savanna grasshopper complex (Orthoptera) in Mali // *Journal of Invertebrate Pathology.* Vol.73. P.34–39.
- Feyereisen R. 1999. Cytochrome P450 enzymes // *Annual Review of Entomology.* Vol.44. P.507–533.
- Furlong M.J., Groden E. 2001. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine // *Journal of Economic Entomology.* Vol.94. No.2. P.344–56.
- Hajek A.E., Leger R.J. St. 1994. Entomopathogenic fungi // *Annual Review of Entomology.* Vol.39. P.293–322.
- Humber R.A. 1997. Fungi: Identification // Lacey L.A. (ed.): *Manual of techniques in insect pathology.* Academic Press. P.153–185.
- Ishaaya I. 1993. Insect detoxifying enzymes: their importance in pesticide synergism and resistance // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* Vol.22. P.263–276.
- James P.J., Charnley A.K., Reynold S.E. 1994. The effect destruxins on the structure and function of insect malpighia tubus // *IOBC WPRS Bulletin.* Vol.17. P.218–221.
- Krasnoff S.B., Gupta S., Leger St.R.J. et al. 1988. Myco- and entomopathogenic properties of the efrapeptins: toxins of the fungus *Tolypocladium niveum* // *Journal of Invertebrate Pathology.* Vol.58. P.180–188.
- Kucera M. 1978. Properties of acid phosphatase formed in *Galleria mellonella* larvae during microsporidial disease (Lepidoptera) // *Acta entomologica bohemoslovacia.* Vol.75. P.83–89.
- Lomer C.J., Bateman R.P., Johnson D.L., Lagewald J., Thomas M. 2001. Biological Control of Locusts and Grasshoppers // *Annual Review of Entomology.* Vol.46. P.667–702.
- Lomer C.J., Langewald J. 1997. Green Muscle User's Handbook. Cotonou, Benin: Int. Inst. rop. Agric. 12 p.
- Luz K., Digano M.S., Silva I.G, Gordeiro C.M., Aljanabi S.M. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans* // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Vol.93. No.6. P.839–846.
- MacCuaig R.D. 1956. Determination of the resistance of locusts to DNC in relation to their weight, age and sex // *Ann. Appl. Biol.* Vol.44. No.4. P.634–642.
- Samuels R.I., Charnley A.K., Reynolds S.E. 1988. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 stains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta* // *Mycopathology.* Vol.104. P.51–58.
- Serebrov V.V., Bakhvalov S.A., Glupov V.V. 2005. Induction of esterases in larvae of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) during infection by fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. // *Euroasian Entomological Journal.* Vol.4. No.1. P.9–11.
- Serebrov V.V., Maljarchuk A.A., Shternshis M.V. 2006. Spontaneous variability *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. strains as an approach for enhancement of insecticidal activity // 70th anniversary of plant protection institute and annual week of plant health. Plant protection institute, may 28–31 Kostinbrod, Bulgaria. P.62–65.
- Sujak P., Ziemnicki K., Ziemnika J. et al. 1978. Obuchowicz acid and alkaline phosphatase activity in the fat body and midgut of the beet armyworm, *Spodoptera exegua* (Lepidoptera; Noctuidae), infected with nuclear polyhedrosis virus // *Journal of Invertebrate Pathology.* Vol.31. P.7–9.
- Tian L., Feng M.G. 2006. Evaluation of the time-concentration-mortality responses of *Plutella xylostella* larvae to the interaction of *Beauveria bassiana* with a nereistoxin analogue insecticide // *Pest Management Science.* Vol.62. No.1. P.69–76.
- Vey A., Quiot J.M., Mazet I., McCoy C.W. 1993. Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in shake culture // *Journal of Invertebrate Pathology.* Vol.61. P.131–137.
- Vilcinskas A., Jegorov A., Landa Z. et al. 1999. Effect of beauverolide L and cyclosporin A on humoral and cellular immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella* // *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.122. P.83–92.
- Wraight S.P., Ramos M.E. 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* — and *Bacillus thuringiensis tenebrionis* — based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae // *Journal of Invertebrate Pathology.* Vol.90. No.3. P.139–150.



В.Ю. Крюков и др. С.195–204. Вклейка IV. 1 — Имаго *Calliptamus italicus*, поражённые энтомопатогенными грибами: *Beauveria bassiana* (a), *Metarhizium anisopliae* (b); 2 — течение микоза, вызванного *Beauveria bassiana*, у личинок *Leptinotarsa decemlineata*: 1–3 сутки после заражения (a), 4–6 сутки после заражения (b), 10–16 сутки после заражения (гибель) (c–d), 1–2 сутки после гибели (e), 3–5 сутки после гибели (f). Фото С.Г. Удалова и Г.Р. Леднёва (1), В.Ю. Крюкова (2).

V.Yu. Kryukov et al. P.195–204. Plate IV. 1 — Imago of *Calliptamus italicus* infected with entomopathogenic fungi: *Beauveria bassiana* (a), *Metarhizium anisopliae* (b); 2 — Larvae of *Leptinotarsa decemlineata* during *Beauveria bassiana* fungal pathogenesis: 1–3 days after inoculation (a), 4–6 after inoculation (b), 10–16 days after inoculation (death) (c–d), 1–2 days post mortem (e), 3–5 days post mortem (f). Photo by S.G. Udalov and G.R. Lednev (1), V.Yu. Kryukov (2).