

**Динамика гибели азиатской саранчи  
при синхронном заражении энтомопатогенными грибами  
(*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*)  
и бактерией *Pseudomonas* sp.**

Г. Р. ЛЕДНЕВ, В. Ю. КРЮКОВ\*, В. П. ХОДЫРЕВ\*, М. А. ЛЕВЧЕНКО, Б. А. ДУЙСЕМБЕКОВ\*\*,  
А. О. САГИТОВ\*, В. В. ГЛУПОВ\*

Всероссийский институт защиты растений РАСХН  
196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3

\*Институт систематики и экологии животных СО РАН  
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 11

\*\*ДГП научно-исследовательский институт защиты растений РК  
040924, Алматинская обл., Карасайский р-н, пос. Рахат

**АННОТАЦИЯ**

В результате поиска видов и штаммов энтомопатогенных микроорганизмов, обладающих высокой вирулентностью по отношению к азиатской саранче (*Locusta migratoria migratoria* L.), выявлены сочетания патогенов, вызывающие высокую гибель личинок в короткий промежуток времени. При заражении личинок энтомопатогенными гифомицетами *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill и *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin гибель начиналась на 4–5-е сут и достигала 95–100 % на 13–17-е сут после инокуляции. При инфицировании личинок бактерией *Pseudomonas* sp. регистрировалась 30–50%-я смертность на 3–7-е сут эксперимента, после чего гибели не наблюдалось. При синхронном заражении грибом и бактерией отмечена быстрая высокая гибель личинок, при этом в ряде экспериментов показатель  $LT_{50}$  составил всего трое суток. Выяснено, что в погибших насекомых могут сосуществовать оба патогена. При изучении антагонизма гифомицетов и бактерии методом блоков установлено, что грибы не влияют на рост бактерии, а бактерия умеренно подавляет рост грибов.

Разработка и использование биологических препаратов на основе энтомопатогенных гифомицетов (Deutoromycota, Nephromycetes) – одно из наиболее перспективных направлений в микробиологической защите растений от членистоногих-фитофагов.

Одним из серьезных недостатков биопрепаратов, в частности микоинсектицидов, является длительный латентный период инфекции. Его сокращения можно добиться при использовании химических активаторов или смеси энтомопатогенов. Развитие заболеваний

членистоногих в природе часто протекает в форме смешанных инфекций (микстов), в которых ассоциируются как родственные патогены, так и представители отдаленных систематических групп. Изучение взаимодействия патогенов представляет большой практический интерес, так как совмещение разнородных микроорганизмов может приводить не только к повышению инсектицидной эффективности препаратов, но и к сокращению сроков проявления патогенного действия и экономии инфекционного материала [1–3].

Многими авторами [4–9] показана возможность использования против саранчовых гифомицетов *Beauveria* и *Metarhizium*, при этом показатель  $LT_{90}$  обычно изменяется в пределах 7–34 сут и более в зависимости от вида и возраста хозяина, инфекционной нагрузки, погодных условий.

В литературе имеются данные о патогенности неспоровых бактерий рода *Pseudomonas* для различных видов насекомых, в том числе и саранчовых [10, 11]. К частым возбудителям заболеваний насекомых относят *P. aeruginosa* Schroeter, *P. chlororaphis* (Gignard et Sauvageau) и другие виды псевдомонад [12]. Первый из указанных видов отмечен и как возбудитель бактериозов саранчовых [13]. Х. Суитмен [14] отмечает, что эффективность неспоровых бактерий в полевых условиях варьирует и зависит от штамма бактерии, вида насекомых и экологических факторов. Здесь следует отметить, что к настоящему времени не найдено ни одного штамма наиболее известной и широко используемой спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis* Berliner, патогенной для саранчовых [13].

В ходе исследований, направленных на поиск штаммов энтомопатогенных грибов и бактерий, высоковирулентных по отношению к азиатской саранче (*Locusta migratoria migratoria* L.), обнаружено, что сочетание бактерии *Pseudomonas* sp. и энтомопатогенных дейтеромицетов (*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill и *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin) вызывает высокую гибель насекомых в относительно короткий промежуток времени.

Цель настоящей работы – сравнение динамики гибели личинок азиатской саранчи при монозаражениях энтомопатогенными грибами *B. bassiana*, *M. anisopliae*, бактерией *Pseudomonas* sp. и при совместном синхронном заражении грибами и бактерией.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для заражения насекомых использованы культуры из коллекций микроорганизмов Всероссийского института защиты растений РАСХН (С.-Петербург) и Института систематики и экологии животных СО РАН (Новосибирск).

В экспериментах использовали следующие штаммы энтомопатогенных гифомицетов – *Metarhizium anisopliae*: МАК-1 и Р-72, *Beauveria bassiana*: ББК-1 и Саp-31. Все штаммы, кроме Р-72-х, выделены из трупов саранчовых в Карасукском р-не Новосибирской обл. в 2000–2002 гг. Изолят Р-72-х выделен из личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (L.) в ИСиЭЖ СО РАН в 2000 г.

Бактерия *Pseudomonas* sp. – грамотрицательная аэробная палочка, выделенная из лабораторной популяции двупятнистого японского сверчка (*Gryllus bimaculatus* Deg.) в ИСиЭЖ СО РАН в 2005 г. Культура бактерии хорошо растет на МПА, образует серо-зеленый пигмент, диффундирующий в питательную среду. Штамм не обладает патогенностью по отношению к большой вощиной моли (*Galleria melonella* (L.)), черемуховой моли (*Yponomeuta evonymellus* (L.)), колорадскому жуку (*Leptinotarsa decemlineata* (Say)). Также не патогенен для белых лабораторных мышей (*Mus musculus* L.) при пероральном (спаивание суспензии с титром  $1 \times 10^7$  в течение недели) и внутрибрюшинном введении (доза – 1,5 мл, титр –  $5 \times 10^6$ ). В то же время штамм обладает невысокой вирулентностью для средневозрастных личинок сверчков *G. bimaculatus*, смертность которых достигает 15 % на 7-е сут при заражении через воду и корм суспензией с титром  $1 \times 10^7$  кл./мл.

Исследования по оценке биологической активности указанных патогенов в отношении азиатской саранчи проведены на базе лаборатории биотехнологии Казахстанского НИИ защиты растений (Алматинская обл.). В экспериментах использовали личинок IV–V возрастов из прибалхашской популяции *L. migratoria*.

Заражение осуществляли путем однократного обмакивания насекомых в водные суспензии с определенным титром конидий и клеток. Личинок помещали в пластиковые стаканы объемом 700 мл, накрытые сверху тканью. Стаканы располагали на опытном участке под навесом. Каждый вариант ставился не менее чем в четырех повторностях по 5 особей на повторность. Смену корма и учет смертности проводили ежедневно в течение 15–17 сут. Погибших насекомых подсушивали в течение 7 дней и хранили в

холодильнике для дальнейшего определения причин гибели.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные наблюдения показали, что при заражении личинок конидиями гриба *M. anisopliae* (титр -  $1 \times 10^7$  конидий/мл) начало гибели отмечается на 4-5-е сут опыта (рис. 1). Гибель 50 % особей в этом случае наблюдается на 9-11-е сут, а смертность на уровне 85-95 % - на 15-е. При заражении азиатской саранчи штаммами *B. bassiana* гибель отмечена в более сжатые сроки:  $LT_{50}$  - 6-7-е сут,  $LT_{100}$  - 11-12-е сут (рис. 2).

Инфицирование саранчи суспензией *Pseudomonas* sp. с титром  $4 \times 10^7$  кл./мл вызывает 30-50%-ю гибель насекомых в течение 3-7 сут после обработки (см. рис. 1, 2). В последующие сутки кривая смертности выходит на плато и скачков смертности не наблюдается. Гибель на 15-17-е сут составляет 55-65 %.

Анализ данных по синхронному заражению грибами и бактерией показал, что в этих вариантах скорость гибели насекомых значительно выше в сравнении с монозаражениями. Так, при заражении *M. anisopliae* и *Pseudomonas* уже на 5-7-е сут смертность достига-

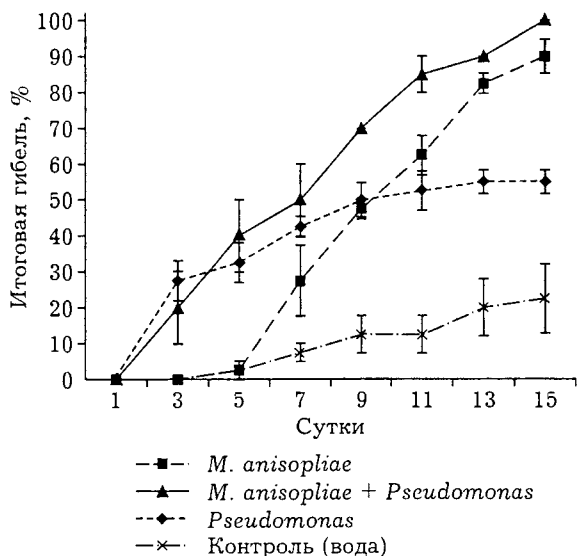


Рис. 1. Динамика гибели личинок 5-го возраста азиатской саранчи при совместном действии *M. anisopliae* (титр -  $1 \times 10^7$ ) и *Pseudomonas* sp. (титр -  $4 \times 10^7$ ). Вертикальные линии показывают ошибку средней

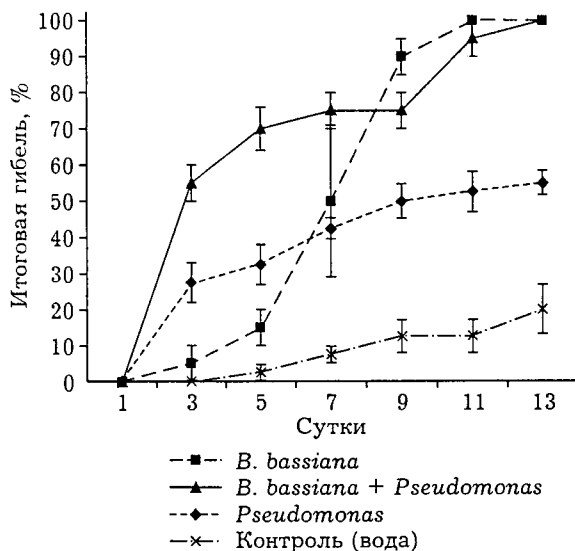


Рис. 2. Динамика гибели личинок 5-го возраста азиатской саранчи при совместном действии *B. bassiana* (титр -  $1 \times 10^7$ ) и *Pseudomonas* sp. (титр -  $4 \times 10^7$ )

ет 40-50 %, а на 15-е сут - 100 %. При инфицировании суспензией, содержащей *B. bassiana* и *Pseudomonas*, наблюдается резкий скачок смертности (70 %) в первые 5 сут эксперимента, при этом  $LT_{50}$  составляет всего 3 сут.

В дальнейших экспериментах к суспензии конидий *B. bassiana* (титр -  $1 \times 10^7$  конидий/мл) добавляли различное количество *Pseudomonas*. Титр последнего изменяли в пределах от  $4 \times 10^5$  до  $4 \times 10^7$  кл./мл. При заражении азиатской саранчи этими суспензиями везде отмечается 90-100%-я гибель на 11-13-е сут эксперимента. В данном случае наблюдается два пика смертности: первый - на 2-4-е сут, второй - на 7-12-е сут опыта (рис. 3). При заражении чистой суспензией гриба первый пик отсутствует и основная гибель (75 %) приходится на 7-9-е сут эксперимента. С повышением титра *Pseudomonas* sp. первый пик гибели увеличивается, достигая максимума (55 %) при титре бактерии  $4 \times 10^7$  кл./мл.

Анализ симптоматики трупов личинок в вариантах со смешанной инфекцией показал, что насекомые, погибшие в первые 5-7 дней после заражения, имеют характерные признаки бактериоза - разжижение внутренних органов и покровов, часто специфический запах. Иногда из ротовых органов или анального отверстия выдувается темная капля, ко-

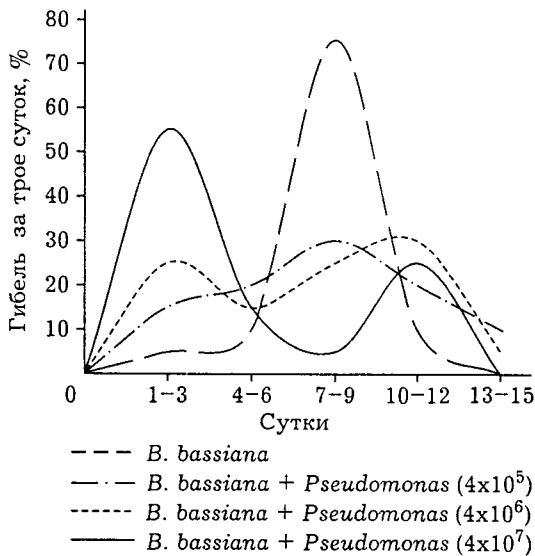


Рис. 3. Динамика гибели азиатской саранчи при совместном инфицировании *B. bassiana* (титр  $- 1 \times 10^7$ ) и *Pseudomonas* sp. с различным титром

торой насекомое приклеивается к кормовому растению. Трупы более позднего периода эксперимента (8-17-е сут) мумифицируются, что свойственно для типичных мюскардинозов.

Выделение патогенов из погибших насекомых проведено через 4 мес. после хранения в холодильнике. Гриб *Metarhizium* не выделен ни из одного экземпляра, включая варианты с монозаражением зеленой мюскардиной. Причины этого не выяснены. Не дало результатов и приготовление суспензии из растертых трупов с последующими последовательными разведениями и высевом на агаризованные среды Ваксмана и Чапека. Из таких трупов выделяются только типичные сапротрофные виды грибов из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*.

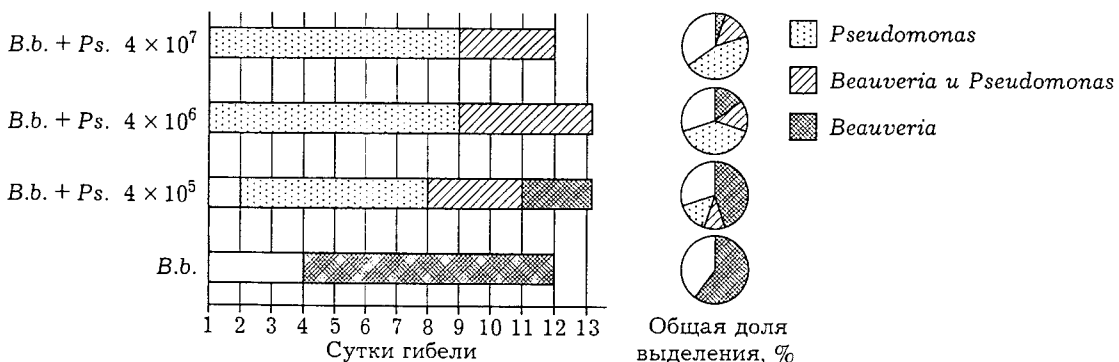


Рис. 4. Выделение гриба и бактерии из трупов азиатской саранчи в опыте с совместным заражением *B. bassiana* (титр  $- 1 \times 10^7$ ) и *Pseudomonas* sp. (титр от  $4 \times 10^5$  до  $4 \times 10^7$ )

Результаты выделения *Pseudomonas* sp. и *B. bassiana* представлены на рис. 4. В вариантах с совместным заражением бактерия выделяется из насекомых, погибших на 2-13-е сут опыта, а обрастание грибом отмечено на 8-е и последующие сутки гибели. В вариантах с монозаражением *B. bassiana* мицелием обрастают трупы 4-х и последующих суток эксперимента. С повышением титра *Pseudomonas* увеличивается доля его выделения и снижается - особей, обрастающих мицелием, причем обрастают особи, погибшие на более поздних сутках эксперимента. Обращает на себя внимание факт сосуществования и сохранения жизнеспособности в погибших особях обоих патогенов. Доля трупов, из которых выделены как бактерия, так и гриб, составила 10-15 %.

При изучении антагонизма *Pseudomonas* и дейтеромицетов *in vitro* использован метод блоков. Выяснено, что исследуемые дейтеромицеты не влияют на рост бактерии, а *Pseudomonas* умеренно подавляет рост грибов. Зоны угнетения на среде Ваксмана составили для *B. bassiana* - 4,5 мм, для *M. anisopliae* - 7,5 мм при диаметре блоков 12 мм. Сходные данные по угнетению роста *B. bassiana* различными видами рода *Pseudomonas* получены В. А. Тюлпановой [15] и Т. И. Громовых [16].

Таким образом, энтомопатогенные грибы вызывают высокую смертность саранчовых, при этом для мюскардинозов характерно длительное течение. *Pseudomonas* вызывает гибель насекомых в первые несколько дней после заражения, но приводит к гибели лишь 50-65 % особей. Совместное инфицирование

насекомых энтомопатогенными гифомицетами и *Pseudomonas* sp. приводит к уменьшению показателя ЛТ и наибольшей биологической эффективности. Бактерия *Pseudomonas* sp. проявляет антагонистические свойства по отношению к грибам, однако в погибших насекомых могут сохраняться оба патогена. Данное сочетание энтомопатогенных микроорганизмов является перспективным при создании комплексного препарата для снижения численности саранчовых.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Е. В. Логинов, В. А. Павлюшин, Интегрированная защита растений от вредителей, Новосибирск, 1987, 123–134.
2. С. Vajan, *Ekol. Pol.*, 1973, 21: 46, 715–729.
3. S. P. Wraight, M. E. Ramos, *J. Invertebr. Pathol.*, 2005, 90: 3, 139–150.
4. А. А. Нуржанов, Энтомопатогенные микроорганизмы стадных саранчовых Узбекистана и перспективы их использования в биологической защите растений: Автореф. дис. ... канд. биол. наук, JL, Всерос. ин-т защиты растений, 1989.
5. Б. Н. Огарков, Г. Р. Огаркова, М. Л. Кальтышев, В. И. Курчаков, Использование микроорганизмов для борьбы с вредными насекомыми в сельском и лесном хозяйстве, Иркутск, 1980, 90–94.
6. Г. Р. Огаркова, Энтомопатогенные бактерии и грибы в защите растений, Иркутск, 1985, 118–127.
7. Б. Н. Огарков, Г. Р. Огаркова, Энтомопатогенные грибы Восточной Сибири, Иркутск, Изд-во Иркут. ун-та, 2000.
8. C. J. Lomer, R. P. Bateman, D. L. Johnson et al., *Ann. Rev. of Entomology*, 2001, 46, 667–702.
9. C. J. Lomer, J. Langewald, *Green Muscle User's Handbook*, Cotonou-Benin, Int. Inst. rop. Agric., 1997.
10. В. П. Приставка, *Микробиология*, 1965, 34: 5, 925–928.
11. Я. Вайзер, Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. М., Колос, 1972.
12. В. И. Полтев, И. Н. Гриценко, А. И. Егорова и др., Микрофлора насекомых, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1969.
13. А. В. Лачинский, М. Г. Сергеев, М. К. Чильдебаяев и др., Саранчовые Казахстана, Средней Азии и сопредельных территорий, Ларами, 2002.
14. Х. Суитмен, Биологический метод борьбы с вредными насекомыми и сорными растениями, М., Колос, 1964.
15. В. А. Тюльпанова, В. Г. Тюльпанов, Т. И. Попруго, Л. Д. Игнатенко, Энтомопатогенные бактерии и грибы в защите растений, Иркутск, 1985, 88–93.
16. Т. И. Громовых, Энтомопатогенные грибы в защите леса, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1982.

## Dynamics of Mortality of the Migratory Locust under Synchronous Infection with Entomopathogenic Fungi (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) and Bacteria *Pseudomonas* sp.

G. R. LEDNEV, V. Yu. KRYUKOV, V. P. KHODYREV, M. A. LEVCHENKO,  
B. A. DUJSEMBEKOV, A. O. SAGITOV, V. V. GLUPOV

As a result of search of the species and strains of entomopathogenic fungi and bacteria virulent to migratory locust (*Locusta migratoria migratoria* L.), the combinations causing high mortality of insect in a short time interval were found. After the *L. migratoria* was infected with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, we observed 4–5 days latency time, after which a sharp increase in larvae mortality was observed, reaching 95–100 % within 13–17 days after inoculation. The mortality of *L. migratoria* after infection with *Pseudomonas* sp. bacteria was approximately 30–50 % within 3–7 days of the experiment. Later the mortality of the locust was not observed. When we made synchronous inoculation with fungi and bacteria, the speed of larvae mortality was higher in comparison with mono-infections, and  $LT_{50}$  was about three days. The microbiological analysis of the dead insects showed that co-existence of both pathogens in the locusts is possible. To determine the antagonism between *Pseudomonas* and fungi on the synthetic nutrient medium, the blocking method was used. We showed that the fungi do not affect the bacteria growth, and the *Pseudomonas* affect the fungi growth only insignificantly.