

Особенности развития микозов оранжерейной белокрылки
Trialeurodes vaporariorum в зависимости от стратегии
паразитизма штаммов *Lecanicillium muscarium*

Development of mycoses of *Trialeurodes vaporariorum* is dependent
upon the parasitism strategy of *Lecanicillium muscarium* strains

Г.В. Митина, И.В. Сендерский, А.Л. Первушин
G.V. Mitina, I.V. Senderskij, A.L. Pervushin

Всероссийский институт защиты растений Россельхозакадемии, шоссе Подбельского 3, Санкт-Петербург, Пушкин 196608
Россия. E-mail: galmit@rambler.ru.

All-Russian Institute of Plant Protection, Russian Academy of Agricultural Sciences, Shosse Podbelskogo 3, Saint-Petersburg,
Pushkin 196608 Russia. E-mail: galmit@rambler.ru.

Ключевые слова: энтомопатогенные грибы, *Lecanicillium* spp., оранжерейная белокрылка, *Trialeurodes vaporariorum*, патогенность, токсины, флуоресцентная микроскопия.

Key words: entomopathogenic fungi, *Lecanicillium* spp., greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, pathogenicity, toxins, fluorescent microscopy.

Резюме. Методом флуоресцентной микроскопии изучены особенности ранних этапов патогенеза, вызванного штаммами *Lecanicillium muscarium* с различными стратегиями паразитизма, у оранжерейной белокрылки. Показано, что штаммы, активно выделяющие токсины в культуральную жидкость, колонизируют хозяина медленнее, чем штаммы, не выделяющие токсины, и характеризуются предварительным поверхностным ростом на кутикуле. Различия между этими штаммами определялись скоростью прорастания конидий и проникновением гриба через кутикулу, а также скоростью образования бластоспор и интенсивностью колонизации насекомого.

Abstract. Early stages of mycoses caused by the strains with different strategy of parasitism were studied by the means of fluorescent microscopy on greenhouse whitefly larvae *Trialeurodes vaporariorum*. It was shown that the toxin-producing strains colonize the host slower as compared to the strains which do not produce toxins. The toxigenic strains are characterized by preliminary surface growth on the cuticle. The two strains are different in the speed of spore germination and fungal penetration through the cuticle, as well as the blastospore formation rate and the intensity of insect colonization.

Введение

Энтомопатогенные грибы рода *Lecanicillium* W. Gams at Zare (ранее комплексный вид *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas) имеют важное значение в регуляции численности природных популяций членистоногих, прежде всего насекомых отряда *Homoptera*. Такие виды, как *L. muscarium*, *L. longisporum* и *L. lecanii* успешно используются за рубежом в качестве продуцентов микробиологических препаратов против сосущих вредителей [Hall, 1981; Kim et al., 2007; Faria, Wraight, 2007]. Как и многие энтомопато-

генные микромицеты, виды *Lecanicillium* способны к образованию инсектицидных метаболитов [Murakoshi et al., 1978; Claudon, Grove, 1982; Grove, 1984; Soman et al., 2001; Charnley, 2003; Butt et al., 2009; Митина и др., 2012]. Последние могут не только ускорять гибель насекомого-хозяина, но и изменять характер протекания инфекции. В зависимости от вклада токсинов выделяют две крайние стратегии развития возбудителей микозов насекомых: токсигенную и эпизоотийную или ротовую [Борисов, 1990; Воронина, 1997; Kershaw et al., 1999; Charnley, 2003; St. Leger, 2007; Крюков и др., 2011]. В естественных условиях чаще встречаются штаммы со средним уровнем вирулентности, низкой токсигенностью и высокой жизнеспособностью, которые реализуют эпизоотийную стратегию, обеспечивающую длительное сохранение инфекции [Борисов, 1990; Борисов и др., 2001]. Более редки высоковирулентные токсигенные штаммы, которые вызывают быструю гибель насекомого-хозяина без последующего развития длительных эпизоотий [Борисов, 1990; Яркулов и др., 2006]. Сравнительное изучение микозов, вызываемых штаммами с различной стратегией на примере гриба *Metarhizium anisopliae* s.l. позволило выявить незавершенный жизненный цикл для высокотоксигенных штаммов и неспособность к споруляции на погибших насекомых [Kershaw et al., 1999; Крюков и др., 2011].

Подобный эффект был установлен и для грибов рода *Lecanicillium*: симптомы ранних токсикозов в результате заражения насекомых из отряда *Homoptera* отмечали ряд исследователей [Hall, 1976; Гиндина и др., 1990; Митина, 1992]. В отдельных случаях регистрировали гибель насекомых без признаков колонизации гемолимфы [Baird, 1954; Hall, 1976].

Установлена корреляция между вирулентностью и образованием токсинов грибов рода *Lecanicillium* [Митина и др., 1997].

В результате недавнего изучения нами вирулентных и токсигенных свойств 36 коллекционных штаммов *Lecanicillium muscarium* были отобраны два высоковирулентных модельных штамма, один из которых вызывал обильное конидиальное спороношение на трупах насекомых и проявлял эпизоотийную стратегию, а другой — быструю гибель с признаками токсикоза, проявляя токсигенную стратегию при заражении виковой тли и оранжерейной белокрылки.

Хронологическая последовательность развития микозов, вызываемых различными видами *Lecanicillium*, детально изучена для картофельной тли *Macrosiphum euphorbiae* T. [Askary et al., 1999], западного цветочного трипса *Frankliniella occidentalis* P. [Schreiter et al., 1998], японской восковой ложнощитовки *Ceroplastes japonicus* G. и мягкой ложнощитовки *Coccus hesperidum* L. [Liu et al., 2009; 2011]. Процесс инфицирования оранжерейной белокрылки *Trialeurodes vaporariorum* West. (Homoptera: Aleyrodidae) его природным патогеном *Lecanicillium muscarium* изучен недостаточно. При этом оранжерейная белокрылка относится к одному из наиболее распространённых и опасных вредителей тепличных растений.

Целью данной работы было изучение особенностей патогенных процессов при заражении оранжерейной белокрылки штаммами гриба *L. muscarium* с различной стратегией.

Материалы и методы

Грибные изоляты. Работа проводилась со штаммами *Lecanicillium muscarium* V1 24 и V1 72 (Материалы Государственной Коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей, ВИЗР (WFCC WDCM №760)).

Штамм V1 24 изолирован Б.А. Борисовым в 1985 году из имаго медяницы (Homoptera: Psyllodea) в Лосиноостровском районе Московской обл. Текстура колоний при росте V1 24 на среде Чапека пушистая, реверс светло-бежевый, диаметр колоний через 10 суток роста 34 мм. Размер конидий 6,0–6,5 x 2,0–2,1 мкм.

Штамм V1 72 изолирован в 1999 г. Б.А. Борисовым из погибшей личинки жимолостной белокрылки *Aleurodes lonicerae* (Homoptera: Aleyrodidae) в г. Долгопрудный Московской области. Штамм V1 72 образует на среде Чапека колонии бархатистой текстуры с бежевым реверсом, диаметр колоний через 10 суток роста достигает 39 мм. Размер конидий 3,3–3,6 x 1,5–1,6 мкм.

На агаризованных средах Чапека, Сабуро оба штамма образуют выпуклые округлые колонии с ровными краями и с хорошо развитым воздушным мицелием белого цвета, при пересевах сохраняют стабильность морфологических признаков. Штам-

мы хранили в криопробирках в глицерине при –80 °С и на среде Чапека с агаром на косяках при +4 °С.

При заражении виковой тли штамм V1 24 проявлял высокую вирулентность (на уровне 70 %), при этом у 15 % тлей наблюдали гибель с симптомами токсикоза. При инфицировании тли штаммом V1 72 вирулентность была 80 %, штамм характеризовался интенсивным обильным конидиальным спороношением, гибель с симптомами токсикоза не наблюдалась.

Видовая идентификация штаммов *L. muscarium* проведена на основе секвенирования участка митохондриального гена *nad1* [Митина и др., 2013].

Для получения конидий штаммы высевали уколочком на агаризованную среду Чапека в чашках Петри диаметром 9 см и культивировали в течение 7–10 дней при температуре 26 °С. Конидии смывали стерильной водой с добавлением Твина-80 (0,025 %) и использовали для приготовления рабочих суспензий, их титр определяли в камере Горяева.

Тест на патогенность. Вирулентность штаммов в отношении оранжерейной белокрылки *T. vaporariorum* определяли на личинках 2–3 возраста, находящихся на растениях фасоли [Митина, Сокошникова, 2013]. Личинок заражали опрыскиванием споровыми суспензиями штаммов гриба с титром $5 \cdot 10^6$ спор/мл из ручного пульверизатора. Учёты проводили по живым личинкам, поскольку от заражённых грибом личинок часто оставались лишь остатки кутикулы, на 5-е, 8-е и 14-е сутки после заражения. Опыты проводили дважды в 4 повторностях. В качестве контроля использовали 0,025 %-ный водный раствор Твина-80.

Тесты на токсигенность. Изучение инсектицидной активности токсинов, содержащихся в культуральной жидкости и в экстракте из биомассы штаммов *L. muscarium*, проводили на личинках 2–3 возраста виковой тли *Megoura viciae* В. Штаммы выращивали в глубинной культуре на пептоно-глюкозной среде (состав среды в г/л: KH_2PO_4 — 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1, MgSO_4 — 1, глюкоза — 20, дрожжевой экстракт — 1, пептон — 10; pH = 6,5), биомассу отделяли от нативного раствора фильтрованием через бумажный фильтр «Красная лента» и высушивали при 35 °С. Фильтрат дополнительно центрифугировали при 14000 оборотов/мин в течение 10 мин для отделения от бластоспор. Нативный раствор в объёме 0,3 мл наносили на фильтровальные диски в пластиковых чашках Петри диаметром 3 см, на которые затем подсаживали виковую тлю и учитывали смертность через 2, 4 и 18 часов. Токсины из сухой биомассы экстрагировали метанолом (1:10) в течение 30 мин в ультразвуковой ванне. Полученный экстракт фильтровали, фильтрат наносили на диск и высушивали на воздухе до полного испарения метанола, после чего смачивали водой. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Световая и флуоресцентная микроскопия. Личинки белокрылки 2–3 возраста, заражённые штаммами *L. muscarium* V1 24 и V1 72, изучали с помощью

Таблица 1. Вирулентность и инсектицидная активность токсинов штаммов *L. muscarium* VI 24 и VI 72
Table 1. The virulence and insecticidal activity of the toxins from *L. muscarium* strains VI 24 and VI 72

Штамм	Доля личинок белокрылки с различными симптомами на 4-е сутки, % *		Смертность оранжерейной белокрылки по суткам, %			Инсектицидная активность (смертность виковой тли), %	
	с признаками микоза	с признаками токсикоза	4-е	5-е	8-е	культуральный фильтрат	экстракт из мицелия
VI 24	2,6	5,6	8,2	12,5	60,0	18,5	20,0
VI 72	19,8	0	19,8	22,8	86,3	0	9,3
Контроль	0	0	0	1,2	2,5	0,0	6,7
НСР			0,3	0,5	0,9	0,5	2,5

* визуально отмеченные симптомы микоза в виде конидиально-мицелиального налёта гриба на погибших особях и симптомы токсикоза (желтый или коричневый цвет кутикулы, усыхание, без признаков конидиально-мицелиального налёта).

флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Imager M1. В качестве красителя использовали Calkafluor White (Sigma). В основу эксперимента положен метод изучения адгезии и прорастания конидий *Beauveria bassiana* на кутикуле гусениц *Galleria melonella* [Dubovskiy et al., 2013]. При флуоресцентном методе визуализации прорастающие конидии отличались более яркой флуоресценцией по сравнению с непроросшими вследствие более высокого содержания хитина, с которым неспецифически связывался флуорохром [Monheit et al., 1984; Butt, 1997].

Для инфицирования насекомых диски листьев фасоли диаметром 1 см, предварительно заселённые личинками белокрылки, погружали в конидиальную суспензию (титр $5 \cdot 10^6$ спор/мл) на 1 минуту, после чего их переносили в чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу и выдерживали при температуре 25 °С и постоянном освещении для наблюдения за развитием микозов. Листовые диски отбирали через 3, 6, 13, 19, 24 и 48 часов после заражения, отмывали в 0,01 %-ном Тритоне X-100 и дистиллированной воде от неприкрепившихся к кутикуле насекомых конидий и фиксировали в растворе Карнуа в течение 1,5–2 часов, затем переносили в 96 %-ный этанол и хранили до микроскопирования. Раствор Calkafluor (0,1 % в воде) наносили непосредственно на диск, выдерживали 1 мин и тщательно промывали дистиллированной водой от красителя, удаляя избыток жидкости с помощью фильтровальной бумаги. При использовании данного подхода листовые диски становились прозрачными, а личинки белокрылки оставались прикрепленными к листовой поверхности. Образцы предварительно просматривались в световом поле на минимальном увеличении для выявления личинок. Просмотр грибных структур и подсчёт конидий проводили в 10 полях зрения на 5–6 личинках.

Результаты

При заражении *T. vaporariorum* штаммами VI 24 и VI 72 было установлено, что оба штамма обладают сравнительно высокой вирулентностью: смертность личинок на 8-е сутки после заражения составила 60 %

и 86,3%, соответственно (табл. 1). Время гибели 50 % личинок (LT_{50}) после инфицирования VI 72 наступало через 6,2 суток, а после заражения штаммом VI 24 — через 7,2 суток. На 4-е сутки после заражения были заметны внешние признаки микоза на отдельных личинках. При этом VI 72 вызывал развитие конидиального спороношения и мицелия на 20 % личинок белокрылки, а VI 24 только на 2,6 % личинок. Начиная с 7-х суток, на личинках белокрылки, заражённых VI 72, развивалась грибная колония диаметром 3–4 мм. Мицелиальный рост VI 24 на заражённых личинках был менее обильным (рис. 1). В результате токсического действия штамма VI 24 часть личинок на 4-е сутки высыхала и желтела. Отдельные особи становились коричневыми, на них не развивались грибные структуры. При заражении штаммом VI 72 не было обнаружено личинок с признаками токсикоза.

В дальнейшем штаммы были охарактеризованы по инсектицидной активности токсинов, продуцируемых *in vitro* при росте в глубинной культуре. Свежий культуральный фильтрат VI 24 вызывал 18,5 % смертности личинок виковой тли через 4 часа после контакта, а экстракт из биомассы (смесь мицелия и бластоспор) — 20,0 % (табл. 1). Основными признаками токсикоза, проявлявшимися через 15–20 минут после начала тестирования, были вялость, судороги и паралич конечностей. Пожелтение кутикулы развивалось через 1–2 часа, смертность наступала в течение 1–4 часов. Через 18 часов после контакта смертность виковой тли от культурального фильтрата VI 24 возросла до 44,4 %. Такое повышенное токсинообразование подтверждает наше предположение о токсигенной стратегии данного штамма. Схожие симптомы токсикоза были обнаружены при испытании экстрактов из мицелия *V. lecanii* на тле разных видов и западном цветочном трипсе [Gindin et al., 1994; Митина и др., 2002].

Штамм VI 72 проявлял низкую инсектицидную активность экстракта из биомассы (9,3 % смертности личинок), а культуральный фильтрат не вызывал смертности виковой тли даже через 18 часов после применения. Отсутствие инсектицидной активности в культуральной жидкости и экстракте мицелия штам-

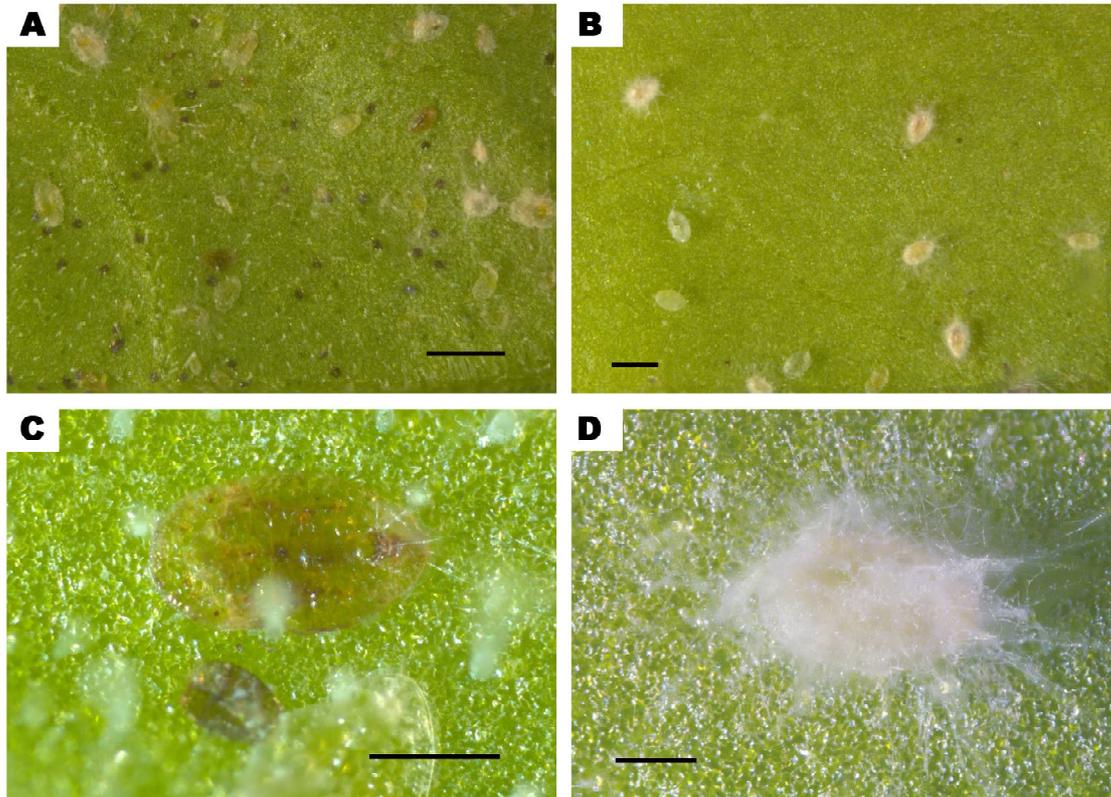


Рис.1. Личинки *T. vaporariorum* на 7-е сутки после заражения модельными штаммами *L. muscarium* VI 24 (A, C) и VI 72 (B, D). Масштабная линейка: A, B — 1 мм; C, D — 0,25 мм.

Fig. 1. *T. vaporariorum* larvae on the 7 day after inoculation with the model strains of *L. muscarium* VI 24 (A, C) and VI 72 (B, D). Scale bar: A, B — 1 mm; C, D — 0.25 mm.

ма VI 72 дополнительно характеризует его как штамм эпизоотийного типа.

Возможно, основные различия в инфекционном процессе, вызываемом штаммами двух типов, происходят на ранних этапах инфицирования (до 3-х суток). Для выявления этих различий было проведено флуоресцентное микрофотографирование заражённых личинок белокрылки, отобранных на определённые часы после инфицирования.

Уже через 3 часа после заражения токсигенным штаммом VI 24 многочисленные адгезированные конидии наблюдались по всей поверхности тела на-

секомого. При заражении эпизоотийным штаммом VI 72 наблюдали многочисленные прикрепившиеся конидии с признаками прорастания. При этом конидии штамма VI 72 увеличились почти вдвое по сравнению с исходными и в среднем составили 6,82x2,95 мкм. Конидии токсигенного штамма VI 24 увеличились в размерах незначительно.

Различия в уровне колонизации личинок белокрылки штаммами двух типов обнаружены, начиная с 6 часов после заражения (табл. 2). Прорастающие конидии токсигенного штамма VI 24 формировали длинные ростовые трубки, в то же время для эпизоо-

Таблица 2. Этапы развития микозов личинок оранжевой белокрылки после заражения штаммами *L. muscarium* с разными патогенными стратегиями

Table 2. The stages of mycoses development on the whitefly larvae after inoculation by the strains of *L. muscarium* with different pathogenic strategies

Штамм	Время после заражения личинок <i>T. vaporariorum</i> , час.					
	6	13	19	24	48	
VI 24	ростовая трубка 20–30 мкм	прорастание конидий больше 50%	дальнейшее удлинение ростовых трубок	образование отдельных аппрессорий, единичное внедрение	рост гиф по поверхности, образование дополнительных аппрессорий	выход гиф из тела насекомого в отдельных точках, бластоспоры
VI 72	ростовая трубка 5–8 мкм	прорастание конидий больше 50%	биполярное прорастание, образование аппрессорий, случаи внедрения	образование аппрессорий больше 50 %, множественное внедрение	выход гиф из тела насекомого, массовое образование бластоспор	разрастание воздушного мицелия

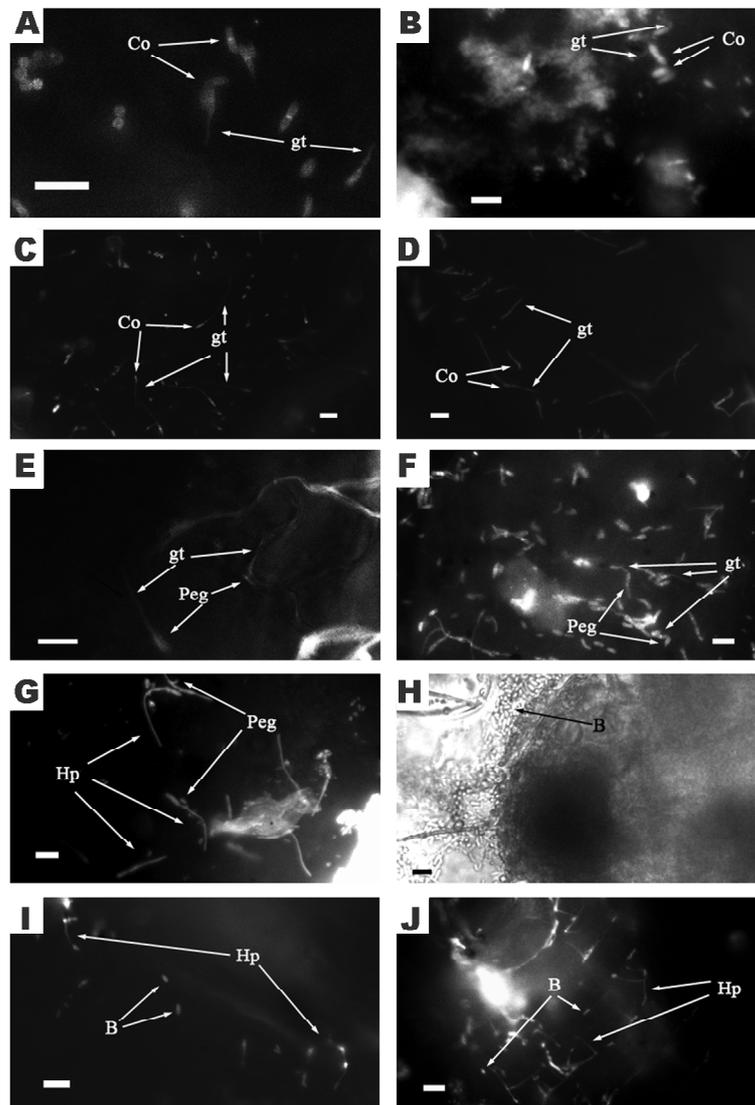


Рис. 2. Световая микроскопия с использованием флуоресценции кутикулы личинок *T. vaporariorum* после заражения модельными штаммами *L. muscarium* VI 24 (левый столбец) и VI 72 (правый столбец). Масштабная линейка = 3 мм. А — прорастание конидий (Co) и формирование длинной ростовой трубки (gt) через 6 часов после заражения. В — прорастание конидий и формирование короткой ростовой трубки через 6 часов после заражения. С — массовое прорастание конидий (Co), удлинение ростовых трубок (gt), латеральный рост через 13 часов после заражения. D — биполярное прорастание конидий (Co) и образование нескольких ростовых трубок (gt), направленных к кутикуле, и внедрение через 13 часов после заражения. E — формирование аппрессорий (Peg) в виде утолщений на конце ростовой трубки (gt) и внедрение в отдельных сайтах через 19 часов после заражения. F — массовое формирование аппрессорий (Peg) на конце коротких ростовых трубок и внедрение через 19 часов после заражения. G — разрастание отдельных гиф (Hp) по поверхности и дополнительного образования аппрессорий (Peg) через 24 часа после заражения. H — выделение массы бластоспор из внутренних органов через 24 часа после заражения (просмотр в световом поле). I — выход наружу отдельных гиф (Hp) и бластоспор (B) через 48 часов после заражения. J — разрастание мицелия в местах выхода гиф и выход бластоспор через 48 часов после заражения.

Fig. 2. Fluorescent microscopy of the cuticle of *T. vaporariorum* larvae after inoculation with the model strains of *L. muscarium* VI 24 (left column) and VI 72 (right column). Scale bar — 3 mm. A — germination of conidia (Co) and formation of a long germination tube (gt), 6 hours after inoculation. The amount of germinated spores is more than 50 %. B — germination of conidia and formation of a short germination tube, 6 hours after inoculation. The amount of germinated spores is more than 50 %. C — mass germination of conidia (Co), elongation of germ tubes (gt), lateral growth, 13 hours after inoculation. D — bipolar germination of conidia (Co) and formation of multiple germ tubes (gt), directed to the cuticle, and penetration within 13 hours after inoculation. E — formation of the penetration pegs (Peg) in the form of nodules at the end of the germ tube (gt) and the invasion in the individual sites in 19 hours after inoculation. F — mass formation the penetration pegs (Peg) at the end of short germ tubes and invasion, 19 hours after inoculation. G — proliferation of the individual hyphae (Hp) on the surface and additional formation of the penetration pegs (Peg), 24 hours after inoculation. H — release of numerous blastospores out of the internal organs, 24 hours after inoculation (light microscopy). I — appearance of the individual hyphae (Hp) and blastospores (B), 48 hours after inoculation. J — branching of the mycelium in the sites of output of hyphae and blastospores, 48 hours after inoculation.

тийного штамма VI 72 отмечено массовое прорастание конидий с короткими ростовыми трубками (рис. 2А, В). Конидии VI 72 часто прорастали биполярно и формировали аппрессории на концах коротких ростовых трубках, направленных к кутикуле, отдельные точки внедрения гриба были обнаружены уже через 13 часов после заражения. Для токсигенной культуры (VI 24) характерным был поверхностный рост гриба по кутикуле (рис. 2 — С, D). Формирование аппрессорий для этого штамма и внедрение в отдельных точках отмечали на 6 часов позднее. Для эпизоотийного штамма (VI 72) в это время зафиксировано массовое формирование аппрессорий (более 50%) и внедрение (рис. 2Е, F). Через 24 часа после заражения штамм VI 24 образовывал неразветвлённые гифы на поверхности кутикулы и дополнительные аппрессории. В то же время для штамма VI 72 были обнаружены бластоспоры в гемоцеле личинок (рис. 2 — G, H). У отдельных личинок наблюдали обрастание головной части тела насекомого. Завершающий этап развития микоза для штамма VI 72 наблюдали через 48 часов после заражения, когда было отмечено разрастание мицелия в местах прорыва кутикулы гифами гриба. Для VI 24 в это время наблюдали выход наружу единичных гиф (Hr) и бластоспор (B) (рис. 2I, J).

Таким образом, эпизоотийный штамм VI 72 характеризовался более быстрой и более интенсивной колонизацией личинок белокрылки по сравнению с токсигенным штаммом VI 24. Различие во времени проникновения через кутикулу составило около 6 часов. Этап формирования бластоспор внутри тела хозяина после проникновения гиф через кутикулу для эпизоотийного штамма VI 72 также был менее продолжительным по сравнению с токсигенным VI 24, а многочисленные бластоспоры обнаруживались уже через 24 часа после заражения. Для штамма VI 24 бластоспоры обнаружены на сутки позднее — примерно через 48 часов. Различия по времени выхода грибных структур на поверхность кутикулы для обоих штаммов не удалось установить, т.к. это очень кратковременный этап, составляющий всего несколько часов с момента образования бластоспор. Кратковременность этого процесса отмечена при изучении патогенеза, вызванного грибами рода *Lecanicillium* на различных сосущих насекомых [Schreiter et al., 1998; Askari et al., 1999; Liu et al., 2011].

Дальнейшее развитие патогенного процесса происходило на поверхности личинок и характеризовалось для штамма VI 72 обильным разрастанием мицелия и формированием конидиеносцев и конидий. Уже через 72 часа после заражения на личинках были заметны грибные колонии, а через 96 часов размер колоний составлял 2–3 мм. Для VI 24 отмечался более слабый грибной рост на поверхности, который регистрировался визуально через 96 часов после заражения. Цикл развития эпизоотийного штамма VI 72 на личинках белокрылки составил от 24 до 48 часов. Это согласуется с данными, полученными Аванесовым С.Г. при заражении личинок белокрылки

высоковирулентными штаммами *V. lecanii* [Аванесов, 1987]. Для насекомых с более толстой кутикулой (*C. hesperidum* L.) цикл развития патогена составлял около 120 часов [Liu et al., 2011].

Обсуждение

При сравнительном изучении штаммов *L. muscarium* с различными патогенными стратегиями было установлено, что штамм эпизоотийного типа VI 72 колонизировал личинок оранжерейной белокрылки интенсивнее штамма VI 24 с токсигенной стратегией. У эпизоотийного штамма быстрее прорастали конидии, и ростовые трубки гриба быстрее проникали через кутикулу. Образования бластоспор у VI 72 также происходило быстрее, а обрастание насекомого грибом на завершающем этапе инфицирования было сильнее.

Очевидно, что токсигенная стратегия VI 24 обусловлена действием токсинов, высокая инсектицидная активность которых была обнаружена нами при тестировании культуральной жидкости этого штамма. Следует отметить, что для большинства ранее изученных коллекционных штаммов *L. muscarium* и *Lecanicillium* sp. была характерна низкая инсектицидная активность культуральной жидкости и высокая активность экстрактов из мицелия, за которую отвечали, как было установлено, соединения терпеноидной природы [Митина и др., 2012]. Среди изученных токсинов грибов рода *Lecanicillium* сравнительно недавно обнаружены деструксины [Butt et al., 2009]. И хотя они образуются в более низких концентрациях, чем у видов р. *Metarhizium*, не исключено их участие в проявлении токсигенной стратегии, наряду с циклопептидами, органическими кислотами и другими токсинами, продуцируемыми видами *Lecanicillium* [Murakoshi et al., 1978; Vey et al., 2001]. Изученные закономерности для штаммов *L. muscarium* двух типов действия можно также сравнить с различными стратегиями штаммов *M. anisopliae*, различающихся по уровню образования деструксинов. Штаммы с повышенным образованием деструктинов проявляли «токсичную стратегию», вызывая быструю гибель *Manduca sexta* (Lepidoptera), но без последующей споруляции, в отличие от «ростовой стратегии», при которой высоковирулентный штамм активно колонизировал насекомое, при этом не образовывал токсины *in vitro* и не вызывал симптомы токсикоза у *M. sexta* [Kershaw et al., 1999]. Аналогичные данные были получены при сравнительном анализе штаммов *M. anisopliae* s.l. с различными жизненными стратегиями в работе Крюкова В.Ю. с соавторами [Крюков и др., 2011].

Штамм *L. muscarium* VI 24 с токсигенной стратегией способен к образованию бластоспор внутри тела хозяина и к формированию конидий на кутикуле. Эти данные отличаются от результатов, полученных при изучении штамма *M. anisopliae* s.l. токсигенного типа, который не был способен к споруляции на погибших насекомых [Крюков и др., 2011]. При

заражении белокрылки токсичным штаммом важную роль играет тот факт, что на начальном этапе инфицирования VI 24 формирует длинные гифы, разрастается по поверхности кутикулы и только после этого проникает внутрь тела хозяина. Возможно, что в данном случае развитие мицелиальных структур и конидий на кутикуле на 4-е сутки происходило за счёт предварительного разрастания гриба. На способность к сапрофитному росту грибов рода *Lecanicillium* указывает ряд авторов. Так, сапрофитный характер роста *L. lecanii* до проникновения был отмечен при заражении личинок картофельной тли *Macrosiphum euphorbiae* T., при этом ростовые трубки в кутикуле хозяина регистрировали через 24 часа после инокуляции, а проникновению предшествовало обильное разрастание ростовых трубок в гифы и образование плотных колоний на поверхности [Askari et al., 1999]. При изучении патогенеза, вызванного *L. lecanii* на коричневой мягкой щитовке *Coccus hesperidum* L. установлено, что при благоприятных условиях гриб способен одновременно развиваться и на поверхности, и внутри тела насекомого [Liu et al., 2011].

Возможно, способность токсигенного штамма VI 24 к предварительному сапрофитному росту на хозяине обеспечивает ему более успешное выживание в природных условиях по сравнению с высокотоксичными штаммами других видов, имеющими, как следствие повышенной токсичности, неполный жизненный цикл (например, *M. anisopliae* s.l.). Однако слабое развитие грибных структур токсигенного штамма на поверхности хозяина снижает вероятность распространения инфекции. Эти особенности важно учитывать при выборе штаммов, используемых в качестве продуцентов микробиологических препаратов для защиты растений.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Б.А. Борисову (Центр паразитологии института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН) за предоставленные для исследований изоляты грибов. Работа поддержана грантом РФФИ №13-04-01905.

Литература

Аванесов С.Г. 1987. Биологические основы отбора вирулентных штаммов *Verticillium lecanii* (Zimm.) // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Л. 19 с.

Борисов Б.А. 1990. Проблемы создания и использования микоинсектицидных препаратов // Доклады научного симпозиума СЭВ «Изучение энтомопатогенных микроорганизмов и разработка технологий их производства и применения». Румыния, Бухарест: НИИЗР. С.8–22.

Борисов Б.А., Серебров В.В., Новикова И.И., Бойкова И.В. 2001. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты / Глупов В.В. (ред.): Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год. С. 352–427.

Воронина Э.Г. 1997. Энтомофторовые грибы и препараты эпизоотийного и токсического действия // Защита растений. No.5. С.12–13.

Гиндина Г.М., Митина Г.В., Павлюшин В.А. 1990. Токсигенность природных изолятов *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas // Микология и фитопатология. Т.24. Вып.6. С.576–582.

Крюков В.Ю., Дубовский И.М., Ярославцева О.Н., Левченко М.В., Слямова Н.Д., Белгибаева А.Б., Ходырев В.П., Леднёв Г.Р., Глупов В.В. 2011. Сравнительный анализ двух штаммов энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* с разными жизненными стратегиями // Микология и фитопатология. Т.45. Вып.2. С.164–173.

Митина Г.В. 1992. Энтомоцидные токсины гриба *Verticillium lecanii* (Zimm.) — продуцента биопрепарата вертициллин // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Л. 18 с.

Митина Г.В., Сергеев Г.Е., Павлюшин В.А. 1997. Влияние биохимических и морфолого-культуральных особенностей природных изолятов *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas на вирулентность в отношении личинок оранжевой белокрылки // Микология и фитопатология. Т.31. Вып.1. С.57–64.

Митина Г.В., Сокоурнова С.В., Павлюшин В.А. 2002. Выделение и изучение спектра действия фосфолипидов с инсектицидной активностью из энтомопатогенного гриба *Lecanicillium lecanii* // Микология и фитопатология. Т.36. No.6. С.53–59.

Митина Г.В., Сокоурнова С.В. 2013. Характер взаимодействия штаммов *Lecanicillium* spp. при совместном заражении оранжевой белокрылки *Trialetrodes vaporariorum* // Микология и фитопатология. Т.47. Вып.4. С.262–265.

Митина Г.В., Токарев Ю.С., Ули-Маттила Т. 2013. Видовая идентификация штаммов энтомопатогенных грибов рода *Lecanicillium* (= *Verticillium lecanii* s.l.) с помощью молекулярных маркеров // Евразийский энтомологический журнал. Т.12. Вып.5. С.431–437.

Митина Г.В., Юзихин О.С., Исанглин Ф.Ш., Якимов А.П. 2012. Выделение и изучение химической структуры токсина с инсектицидной активностью из гриба *Lecanicillium muscarium* // Научное приборостроение. Т.22. Вып.2. С.3–9.

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, 183 с.

Askary H., Benhamou N., Brodeur J. 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii* // Journal of Invertebrate Pathology. Vol.74. P.1–13.

Baird R.B. 1954. A species of *Cephalosporium* (Moniliaceae) causing a fungus disease in larvae of the European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hbn.) (Lepidoptera: Pyraustidae) // Canadian Entomologist. Vol.86. P.237–240.

Butt T.M. 1997. Complementary Techniques: Fluorescence Microscopy. Lacey L.A. (ed.): Manual of Techniques in Insect Pathology. London: Academic Press. P.255–365.

Butt T.M., El Hadj N.B., Skrobek A. 2009. Mass spectrometry as a tool for the selective profiling of destruxins; their first identification in *Lecanicillium longisporum* // Rapid Communications in Mass Spectrometry. Vol.23. No.10. P.1426–1434.

Charnley A.K. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins // Advances in Botanical Research. Vol.40. P.241–321.

Claudon N., Grove J.F. 1982. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii* // Journal of Invertebrate Pathology. Vol.40. No.3. P.413–418.

Dubovskiy I.M., Whitten M.M. A., Kryukov V.Y., Yaroslavtseva O.N., Grizanova E.V., Greig C., Mukherjee K., Vilcinskas A., Mitkovets P.V., Glupov V.V., Butt T.M. 2013. More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. Vol.280. No. 1763. 10 p.

Faria M.R., Wraight S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage

- and international classification of formulation types // *Biological Control*. Vol.43. P.237–256.
- Gindin G., Barash I., Harari N., Raccach B. 1994. Effect of Endotoxin Compounds Isolated from *Verticillium lecanii* on the Sweetpotato Whitefly, *Bemisia tabaci* // *Phytoparasitica*. Vol.22. No.3. P.189–196.
- Grove J.F. 1984. 23,24,25,27-Pentanorlanost-8-En-3, 22-Diol from *Verticillium lecanii* // *Phytochemistry*. Vol.23. No.8. P.1721–1723.
- Hall R.A. 1976. *Verticillium lecanii* on the aphid *Macrosiphoniella sanborni* // *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.28. P.389–391.
- Hall R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales // Burges H.D. (ed.): *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980*. New York: Academic Press. P.483–498.
- Kershaw M.J., Moorhouse E.R., Bateman R., Reynolds S.E., Charnley A.K. 1999. The Role of Destruxins in the Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for Three Species of Insect // *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.74. No.3. P.213–223.
- Kim J.J., Goettel M.S., Gillespie D.R. 2007. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea* // *Biological Control*. Vol.40. P.327–332.
- Liu W., Xie Y., Xue J., Gao Y., Zhang Y., Zhang X., Tan J. 2009. Histopathological changes of *Ceroplastes japonicus* infected by *Lecanicillium lecanii* // *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.101. P.96–105.
- Liu W., Xie Y., Xue J., Zhang Y., Zhang X. 2011. Ultrastructural and cytochemical characterization of brown soft scale *Coccus hesperidum* (Hemiptera: Coccidae) infected by the *Lecanicillium lecanii* (Ascomycota: Hypocreales) // *Micron*. Vol.42. P.71–79.
- Monheit J.E., Cowan D.F., Moore D.G. 1984. Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. Vol.108. P.616–618.
- Murakoshi S., Ichinoe M., Susuki A., Kanaoka M., Isogai A., Tamura S. 1978. Presence of toxic substances in fungus bodies of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* // *Applied Entomology and Zoology*. Vol.13. P.97–102.
- Schreiter G., Butt T.M., Beckett A., Vestergaard S., Moritz G. 1998. Invasion and development of *Verticillium lecanii* in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* // *Mycological Research*. Vol.9. P.1025–1034.
- Soman A.G., Gloer J.B., Angawi R.F., Wicklow D.T., Dowd P.F. 2001. Vertilecanins: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii* // *Journal of Natural Products*. Vol.64. P.189–192.
- St. Leger R.J. 2007. *Metarhizium anisopliae* as a Model for Studying Bioinsecticidal Host Pathogen Interactions // Vurro M., Gressel J. (Eds.). *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Dordrecht. The Netherlands: Springer. P.179–204.
- Vey A., Hoagland R., Butt T.M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents // Butt T.M., Jackson C.W., Magan N. (Eds.): *Fungi as biocontrol agents*. CAB International, Wallingford. P.311–345.

Поступила в редакцию 23.10.2014