

На правах рукописи

УСПАНОВ

Алибек Маратович

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОТБОРА ШТАММОВ ГРИБА
BEAUVERIA BASSIANA S.L. ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ
САРАНЧОВЫХ В КАЗАХСТАНЕ**

Шифр и наименование специальности:

06.01.07 – защита растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – Пушкин

2013

Работа выполнена в ТОО «Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений» АО «Казагроинновация» МСХ республики Казахстан и Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений Россельхозакадемии (ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии)

Научный руководитель: **Леднев Георгий Рэмович**
кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Сухорученко Галина Ивановна**
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор, руководитель лаборатории
ВНИИ защиты растений Россельхозакадемии

Гришечкина Светлана Денисовна
кандидат биологических наук,
и.о. руководителя лаборатории
ВНИИ сельскохозяйственной
микробиологии Россельхозакадемии

Ведущая организация: **ВНИИ биологической**
защиты растений Россельхозакадемии

Защита состоится 27 июня 2013 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 006.015.01 на базе Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений по адресу: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3.

Факс: (812) 470-51-10; e-mail: vizrpb@mail333.com,

Web-сайт: www.vizrspb.narod.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений.

Автореферат разослан 27 мая 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Галина Анатольевна Наседкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Саранчовые в особенности стадные являются одной из наиболее вредоносных групп многоядных вредителей сельскохозяйственных культур. В настоящее время в станах СНГ для борьбы с ними используются только химические инсектициды. Однако известно, что масштабное применение пестицидов имеет ряд существенных недостатков, важнейшими из которых являются возникновение резистентных популяций вредителей и загрязнение окружающей среды. В связи с этим возникает необходимость поиска альтернативных экологически безопасных методов защиты растений. Одним из таких способов подавления вредных фитофагов является микробиологический метод защиты. Особую актуальность использование биологических приемов снижения численности саранчовых приобретает для водоохранных зон и заповедных территорий, где использование химических пестицидов законодательно полностью запрещено (Сергеев, Лачининский, 2006).

Среди всего разнообразия энтомопатогенных микроорганизмов одной из наиболее перспективных групп, с точки зрения снижения численности саранчовых являются грибы из анаморфных родов - *Metarhizium* и *Beauveria*. Исследования с этими микроорганизмами активно проводятся во многих станах мира (Lomer et al., 2001; Inglis et al., 2007; Charnley, Collins, 2007; Faria, Wraight, 2007). К настоящему времени ассортимент зарубежных микоинсектицидов для снижения численности саранчовых включает 11 наименований (Faria, Wraight, 2007).

На территории СНГ исследования в этом направлении до недавнего времени были немногочисленны и носили эпизодический характер.

К настоящему времени в списках, разрешенных к применению средств защиты растений, как в Казахстане, так и в России нет ни одного препарата на основе энтомопатогенных грибов для снижения численности вредных членистоногих и саранчовых в частности.

Цель работы. Целью работы являлась скрининг штаммов-продуцентов микоинсектицидов на основе гриба *Beauveria bassiana* s.l., эффективных для снижения численности наиболее вредоносных видов саранчовых в условиях Казахстана.

В связи с этим были поставлены следующие **задачи**:

1. Отбор новых штаммов и природных изолятов казахстанского происхождения гриба *B. bassiana* s.l. по признаку вирулентности в отношении саранчовых;
2. Оценка специфичности отобранных культур гриба в отношении насекомых и других систематических групп;
3. Подбор оптимальных концентраций инокулюма для эффективного снижения численности саранчовых;
4. Определение температурных предпочтений отобранных штаммов;
5. Оценка продуктивности перспективных культур гриба при поверхностном и глубинном культивировании;
6. Определение биологической эффективности лабораторных образцов биопрепаратов в полевых условиях.

Научная новизна. Впервые на большой выборке штаммов, выделенных на территории Казахстана, показана высокая гетерогенность *B. bassiana* по признаку вирулентности в отношении саранчовых. Выявлено шесть штаммов гриба *B.*

bassiana, обладающих высокой биологической активностью для представителей данной группы вредителей. Для них подобраны оптимальные титры рабочей суспензии. Показано, что отобранные культуры обладают высокой вирулентностью и на насекомых других систематических групп. Для данных штаммов гриба определены температурные предпочтения и отработаны лабораторные методы глубинной и твердофазной ферментации.

Теоретическая и практическая значимость работы. В качестве перспективных штаммов-продуцентов для создания новых биологических препаратов отобраны два новых штамма гриба *B. bassiana* казахстанского происхождения, обладающие высокой вирулентностью в отношении различных видов саранчовых, продуктивностью и термотолерантностью. Разработаны лабораторные регламенты их производства и подобрана препаративная форма. Показана эффективность лабораторных образцов микоинсектицидов в условиях Юго-Восточного Казахстана.

Основные положения, выносимые на защиту:

- отбор культур гриба *B. bassiana*, выделенных из природных источников, обладающих высокими показателями по основным целевым признакам в качестве потенциальных продуцентов новых противосаранчовых микоинсектицидов. Штамм ЮК₄ – 09 подтвержден инновационным патентом;
- методы культивирования (поверхностного и глубинного) отобранных культур;
- способы использования местных штаммов гриба *B. bassiana* для борьбы с саранчовыми в условиях Юго-Восточного Казахстана.

Апробация работы. Материалы, полученные в ходе исследований, докладывались на 2-м междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2010), 8-м межрегиональном совещании энтомологов Сибири и Дальнего Востока с участием зарубежных ученых, Новосибирск (Россия, 2010), Научной конференции ППС СПбГАУ (С.-Петербург, 2009, 2012), Международной молодежной конференции «Инфекционная патология членистоногих» (С.-Петербург, 2012), 14-м съезде Русского энтомологического общества. (С.-Петербург, 2012.), 3-м съезде микологов России. 10-12 октября (Москва, 2012), 2-й международной научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы и перспективы защиты и карантина растений» (Алматы, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 2 в рецензируемых российских журналах.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, иллюстрирована 14 рисунками и 19 таблицами. Работа состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 215 названий, в том числе 142 на иностранных языках.

Работа выполнялась в 2008 – 2012 гг. в ТОО КазНИИЗиКР АО «Казагроинновация» и ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии при частичной финансовой поддержке проектов по бюджетным программам Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан № 0106РК01034 и Министерства образования и науки Республики Казахстан №.0109РК00270 и 0108РК00070.

Благодарности. Автор выражает благодарность к.б.н., доценту Г.Р. Ледневу (ВИЗР Россельхозакадемии) за руководство научной работой, д.б.н., академику

НАН Республики Казахстан А.О. Сагитову, к.б.н. Б.А. Дуйсембекову, Е.Ж. Баймагамбетову (КазНИИЗиКР, Алматы), к.б.н. М.В. Левченко (ВИЗР Россельхозакадемии), за помощь на всех этапах исследования, Е.М. Макарову (КазНИИЗиКР, Алматы) за ценные замечания, сделанные при работе над рукописью. Признательность за помощь в проведении экспериментальной работы всем сотрудникам лаборатории биотехнологии КазНИИЗиКР, к.б.н. В.Ю. Крюкову и О.Н. Ярославцевой (ИСиЭЖ СО РАН).

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Глава 1 ЭНТОМОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОЗОВ САРАНЧОВЫХ

В главе приводится анализ данных литературы, посвященных распространению основных видов саранчовых на территории Казахстана, видовому составу, симптоматике, жизненным циклам грибов из анаморфных родов, паразитирующих на саранчовых. Дана характеристика основных факторов патогенности. Приведены сведения о методах культивирования энтомопатогенных грибов и их использовании для снижения численности саранчовых

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в течение пяти лет (2008 - 2012 гг.) в лаборатории биотехнологии КазНИИЗиКР и лаборатории микробиологической защиты растений ВИЗР. Полевые испытания биологической активности образцов биопрепаратов проводили в Жамбылской области и Алматинской областях.

В опытах по оценке вирулентности использовали 33 новых штаммов гриба *Beauveria bassiana* s.l., выделенных из патологического материала, собранного в ущелье реки Чапайки (Заилийский Алатау, Алматинская обл.), а также 6 культур, изолированных из погибших насекомых в Кордайском районе Жамбылской области (сухая степь). В качестве эталона использовали штамм ББК-1 из коллекции ВИЗР.

Вирулентность энтомопатогенных гифомицетов оценивали на 7 видах представителей семейства Acrididae (*Locustae migratoria migratoria* L., *Calliptamus italicus* L., *Dociostaurus maroccanus* Thunb., *Calliptamus barbarus* Costa., комплекс видов трибы Dociostaurini, *Oedaleus decorus* Germar, *Chorthippus parallelus* Zett.).

Для определения специфичности изучаемых штаммов грибов в опытах использовали местные природные популяции колорадского жука, яблонной моли и крапивницы, а также лабораторную популяцию большой вошинной огневки.

Культивирование грибов для массового получения конидий грибов производили в поверхностной культуре на агаризованных средах Сабуро и Чапека. Оценку продуктивности штаммов гриба в глубинной культуре осуществляли на жидкой среде Сабуро, а при поверхностном культивировании на сыпучих зерновых субстратах: рисе, пшене, перловой крупе.

Лабораторная оценка вирулентности грибов проводилась по стандартным методикам в садках в климакамерах.

В ходе мелкоделяночных полевых опытов насекомых обрабатывали в их естественных стациях с помощью ранцевого моторного опрыскивателя «Микронер AU-8000» (титр рабочей суспензии из расчета $1 \cdot 5 \times 10^{12}$ конидий/га). Расход рабочей жидкости 10 л/га. Площадь делянки 300 - 400 м².

Глава 3 СКРИНИНГ ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA* ПО ПРИЗНАКУ ВИРУЛЕНТНОСТИ В ОТНОШЕНИИ САРАНЧОВЫХ

3.1 Первичный скрининг штаммов *Beauveria bassiana*

В ходе первых экспериментов оценивали биологическую активность 33 штаммов гриба *B. bassiana* на личинках младших возрастов природной популяции азиатской саранчи.

Выявлена высокая степень гетерогенности изучаемых культур по признаку вирулентности. Только 13 культур гриба (40% от всех испытываемых штаммов) проявили высокую биологическую активность в отношении личинок вредителя (90-100% на 13-е сутки после инокуляции). При этом удельный вес слабовирулентных форм (активность менее 60%) составил 37%.

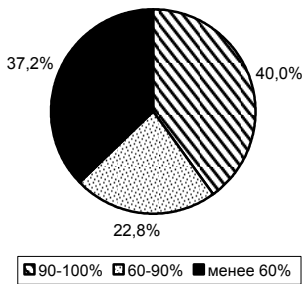


Рисунок 1 - Соотношение культур гриба *B. bassiana*, выделенных из насекомых различных систематических групп по признаку вирулентности на личинках азиатской саранчи

В итоге в качестве наиболее перспективных с точки зрения снижения численности азиатской саранчи были отобраны шесть изолятов гриба: ВСу₁-06, ВСу₂₂-07, ВСо₆-07, ВД₄-07, ЮК-4 и ББК-1.

3.2 Восприимчивость различных видов саранчовых к штаммам *Beauveria bassiana*

Важным элементом при разработке биопрепаратов является определение круга целевых насекомых – вредителей.

В связи с этим нами была оценена чувствительность шести видов насекомых из семейства Acrididae (азиатская саранча, итальянский прус, мароккская саранча, пустынный прус, чернополосая кобылка и конек короткокрылый) к штаммам *B. bassiana*, отобранным в качестве наиболее перспективных по признаку вирулентности на азиатской саранче (ВСу₂₂-07, ЮК-4 и ББК-1).

Все испытываемые штаммы проявили высокую биологическую активность на всех указанных видах саранчовых. К 13-м суткам после заражения все обработанные особи в не зависимости от вида тест-насекомого погибли.

По динамике смертности между видами насекомых выявлены существенные различия. Наиболее высокая скорость гибели характерна для пустынного пруса и чернополосой кобылки (смертности - 85-100%. через неделю после заражения). К 9-м суткам аналогичный уровень биологической активности наблюдался еще для двух видов – итальянский прус и мароккская саранча (86,7-100%). Наибольшую устойчивость показала азиатская саранча. К этому сроку уровень смертности варьировал в пределах от 55 до 90% (в среднем по трем штаммам 75%) (рисунок 2).

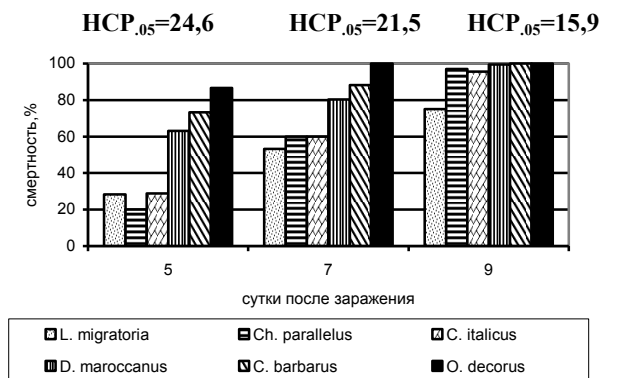


Рисунок 2 - Чувствительность различных видов саранчовых к грибу *B. bassiana* (суммарно по трем штаммам)

Таким образом, наибольшую чувствительность к микозу проявили одиночные виды, занимающие ксерофитные стадии. Близкими к ним по восприимчивости оказались и стадные виды, приуроченные аридным условиям. Наиболее высокая устойчивость характерна для азиатской саранчи. Данный вид в местах резервации занимает гигрофитные стадии.

3.3 Оценка биологической активности изучаемых штаммов на насекомых из других систематических групп

Для определения уровня специфичности штаммов гриба *B. bassiana*, показавших наибольшую вирулентность на саранчовых, нами был проведен ряд экспериментов по оценке биологической активности этих культур на четырех видах насекомых из других систематических групп (жуки и чешуекрылые).

На личинках колорадского жука большинство испытываемых культур гриба показали высокую вирулентность. Для пяти из шести штаммов итоговый уровень смертности хозяина на 13- сутки после заражения составил 100%. Максимальная скорость гибели наблюдалась для штаммов ВCu₂₂-07 и ББК-1 (эталон).

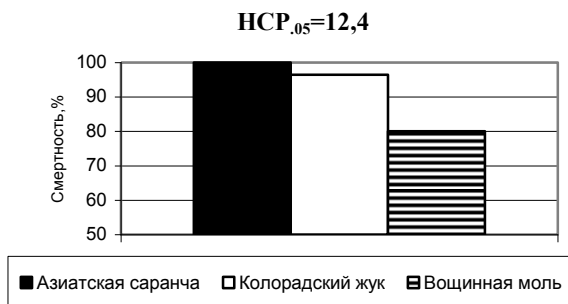


Рисунок 3 - Сравнительная чувствительность трех видов насекомых к грибу *B. bassiana* (в среднем по 5 штаммам)

На личинках младших возрастов вошинной моли выявлен более высокий уровень гетерогенности штаммов по признаку вирулентности. Только для трех из восьми штаммов итоговый уровень смертности составил 100%. По скорости гибели лучшими, также как оказались штаммы ВCu₂₂-07 и ББК-1.

На гусеницах младших возрастов яблонной моли и крапивницы результаты оказались аналогичными, что и на гусеницах вошинной моли. Итоговый уровень смертности (11-е сутки после заражения) вне зависимости от вида насекомого варьировал в пределах от 45 до 95%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что гусеницы чешуекрылых обладают повышенной устойчивостью к возбудителю микоза, по сравнению с личинками колорадского жука. Существенных различий в чувствительности между личинками колорадского жука и азиатской саранчи выявлено не было (рисунок 3).

При этом, два штамма (BCu₂₂-07 и ББК-1) показали наибольшую скорость гибели тест-насекомых, как для всех указанных выше нецелевых видов, так и для личинок азиатской саранчи.

3.4 Зависимость смертности личинок азиатской саранчи и пустынного пруса от концентрации инокулюма

Важнейшим элементом при разработке технологии применения биопрепаратов является определение оптимальных доз патогена.

В этой связи были проведены опыты по определению зависимостей доза – смертность для трех отобранных штаммов гриба *B. bassiana* на личинках младших возрастов азиатской саранчи и пустынного пруса. Использовались рабочие суспензии с четырьмя различными титрами конидий (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7).

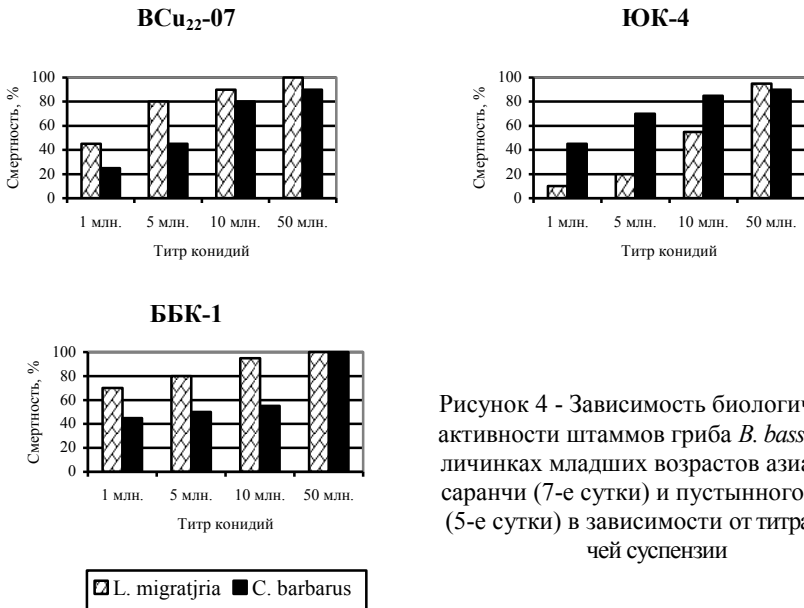


Рисунок 4 - Зависимость биологической активности штаммов гриба *B. bassiana* на личинках младших возрастов азиатской саранчи (7-е сутки) и пустынного пруса (5-е сутки) в зависимости от титра рабочей суспензии

Для личинок азиатской саранчи выявлены существенные различия, как по итоговому уровню смертности, так и по скорости гибели вредителя в зависимости от концентрации инокулюма. Так для штамма BCu₂₂-07 на 9-е сутки после заражения при концентрациях 1×10^7 и 5×10^7 уровень смертности составлял уже 90 и 100%

соответственно, то при минимальном титре (1×10^6) значение этого показателя не превышало 45% (рисунок 4). Этот штамм оказался самым лучшим по скорости гибели хозяина и существенно не различался с эталонной культурой ББК-1 (90-100% к 11-м суткам после заражения).

При минимальной концентрации (1×10^6), итоговый уровень смертности (15-е сутки после обработки) также был достаточно высок и составил 80-100%.

На личинках пустынного пруса также четко прослеживается зависимость восприимчивости личинок к микозу от титра рабочей суспензии гриба. Так если при заражении штаммом ВCu₂₂-07 с титрами 1×10^7 и 5×10^7 уже на 5-е сутки после инокуляции уровень смертности личинок достиг 80 и 90% соответственно, то при уменьшении концентрации до 1×10^6 - 5×10^6 значения этого показателя не превышали 25 – 45%. Аналогичная закономерность была выявлена и для других штаммов.

При этом уровень смертности пустынного пруса в динамике был существенно выше по сравнению с азиатской саранчой. Так к 9-м суткам после обработки во всех вариантах опыта у первого вида все обработанные особи погибли, тогда как для второго смертность при минимальных концентрациях к этому не превышала 10- 80%. Это еще раз подтверждает представленные выше данные по видовой чувствительности саранчовых.

Подводя итог настоящего раздела, следует отметить, что в отношении двух указанных видов саранчовых все три испытываемые культуры показали высокую вирулентность при титрах рабочей суспензии 1×10^7 и 5×10^7 .

3.5 Влияние пассирования на вирулентность штаммов гриба *Beauveria bassiana*

Одним из важных элементов в поддержании вирулентности штаммов-продуцентов является их периодическое пассирование через организм целевого насекомого-хозяина.

В этой связи нами был проведен опыт по определению влияния реизоляции на вирулентность четырех штаммов гриба – два высоковирулентные (ЮК-4 и ББК-1) и два с существенно более низкой биологической активностью в отношении личинок итальянского пруса (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние пассирования на вирулентность гриба *B. bassiana* в отношении личинок младших возрастов итальянского пруса

Штамм	Смертность, % на 7 сутки после заражения		НСР ₀₅
	исходный	реизолят	
BCu ₉ -07	6,7±6,7	63,3±6,7	21,5
BVe ₃ -06	40,0±11,6	73,3±6,7	19,6
ЮК-4	40,0±11,6	66,7±13,3	22,3
ББК-1	60,0±11,6	86,7±13,3	20,5
Контроль	0,0		-
НСР ₀₅	25,34		

На данном виде вредителя во всех вариантах опыта итоговый уровень смертности (13-е сутки после заражения) составил 100%. Однако по скорости гибели хозяина между исходными культурами и их реизолатами для всех испытываемых

штаммов были выявлены существенные различия. Особенно ярко они проявились для менее вирулентных штаммов. Так если к 7-у дню после инокуляции для исходной культуры ВСu₉-06 уровень смертности не превышал 7%, то в варианте с его реиолятом значение этого показателя превысило 63%, что почти в 10 раз выше. Для штаммов ЮК-4 и ББК-1 существенные различия между исходной и пропассированной культурами наблюдались только на 7-й день после заражения и не превышали 30%.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что пассирование через организм целевого насекомого-хозяина существенно повышает скорость гибели насекомых по сравнению с исходным штаммом. Особенно четко эта зависимость проявляется для культур с невысокой вирулентностью.

3.6 Оценка гетерогенности штаммов по признаку вирулентности

Поддержание стабильности по основным целевым признакам перспективных штаммов-продуцентов является одним из важнейших этапов промышленной биотехнологии. В этой связи нами был проведен эксперимент по оценке биологической активности на личинках младших возрастов итальянского пруса моноклоновых изолятов двух штаммов гриба *B. bassiana*, отобранных на предыдущих этапах исследований.

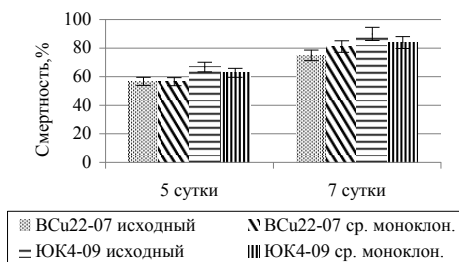


Рисунок 5 - Гетерогенности штаммов гриба *B. bassiana* по признаку вирулентности в отношении личинок итальянского пруса

Итоговый уровень смертности (9-е сутки после заражения), как для исходных культур, так и для моноклоновых изолятов составил 100%.

Несмотря на то, что в динамике смертности наблюдалось относительное высокое варьирование по клонам, существенных различий между ними и исходными культурами обнаружено не было.

Для штамма BCu₂₂-07 на 5-й день после заражения уровень смертности по отдельным клонам варьировал в пределах от 43,3 до 80%, на 7-й день – от 60 до 100%.

В целом средний уровень смертности суммарно по всем клонам не отличался существенно от исходных культур (рисунок 5). Так, если доля погибших особей при обработке исходными культурами на 5-е сутки после заражения составляла 56,7 и 66,7% соответственно, то в среднем по моноклоновым изолятам значения этого показателя составляли 56,6 и 62,7%.

Таким образом, проведенные исследования показали, что оба испытуемых штамма являются достаточно стабильными по признаку вирулентности и, следовательно, перспективны в качестве штаммов-продуцентов новых микоинсектицидов.

ГЛАВА 4 ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA*

4.1 Влияние температуры на прорастание конидий штаммов гриба *Beauveria bassiana*

Известно, что устойчивость гриба к повышенным температурам воздуха в значительной степени определяет его биологическую эффективность. Особенно этот вопрос приобретает актуальность для регионов, характеризующихся жарким и сухим климатом в течение вегетационного сезона.

Оценка термического предпочтения конидий шести высоковирулентных в отношении саранцовых штаммов гриба *B. bassiana*, показала значительную гетерогенность испытываемых культур по данному показателю. Итоговая доля проросших спор (через 72 часа) варьировала в пределах от 0 до 85% (таблица 2).

Таблица 2 - Жизнеспособность конидий штаммов гриба *B. bassiana*. при разных температурах воздуха

Штамм	Уровень прорастания конидий в капле воды, %, (температура, °C), через 72 часа			
	20	25	30	35
Предгорная зона				
BCu ₁ -06	39,4±6,9	36,4±9,9	27,0±7,0	12,6±4,8
BCu ₂₂ -07	53,2±6,1	76,0±3,2	6,2±1,0	0,0±0,0
BCo ₆ -07	65,4±3,9	68,5±4,2	23,6±3,5	0,0±0,0
BD ₄ -07	74,3±10,2	45,5±3,9	5,9±2,6	2,1±0,6
Степная зона				
ЮК-4	70,7±6,3	26,0±11,5	23,6±6,6	33,3±10,4
ББК-1	85,6±6,3	71,3±5,9	51,4±7,9	50,8±9,6
НСР ₀₅	19,8	21,4	15,6	13,4

Для двух культур (BD₄-07 и ЮК-4) максимальный уровень прорастания конидий наблюдается при температуре 20°C, BCu₂₂-07 при 25°C, а для трех остальных культур существенных различий по жизнеспособности конидий при этих температурах не было обнаружено.

При 30°C уровень прорастания конидий для большинства штаммов от 2 до 12 раза ниже по сравнению с более низкими температурами. И только эталонная культура ББК-1 проявила высокую жизнеспособность при данном температурном режиме (51,4%). При 35°C максимальный уровень прорастания конидий наблюдался у штаммов ЮК-4 и ББК-1 (33,3 и 50,8% соответственно). Таким образом, эти культуры, изолированные из ксерофитных стадий, являются наиболее термотолерантными и могут быть рекомендованы для дальнейших исследований.

4.2 Влияние температуры воздуха на интенсивность развития штаммов гриба *Beauveria bassiana* в поверхностной культуре

Оценка динамики радиального роста колоний отобранных штаммов гриба *B. bassiana* в поверхностной культуре на среде Сабуро при разной температуре воздуха показала, что для данной выборки штаммов максимальный рост колоний также наблюдался при температурах 20 и 25°C. Для штамма BCu₁-06 не было выявлено

существенных различий по итоговому диаметру колоний в интервале от 20 и 30⁰С, а для ББК-1 интенсивность роста при 30⁰С была существенно выше по сравнению с более низкими температурами.

Таблица 3 - Влияние температуры воздуха на прирост колоний штаммов гриба *B. bassiana*, на агаризованной среде Сабуро

Штамм	Диаметр колоний, мм на 29-е сутки после посева			
	+20 ⁰ С	+25 ⁰ С	+30 ⁰ С	+35 ⁰ С
Предгорная зона				
BCu ₁ -06	67,5±1,3	64,0±3,0	60,8±2,3	0
BCu ₂₂ -07	87,00±88,12	90,5±1,04	53,33±2,17	2,33±0,33
BD ₄ -07	41,3±0,9	45,7±0,7	21,3±0,9	0
Степная зона				
ЮК-4	42,3±2,0	56,3±0,9	31,3±5,2	24,7±2,2
ББК-1	34,3±0,7	31,3±0,3	48,0±1,5	0
НСР _{.05}	10,5	9,6	9,4	10,9

При 35⁰С относительно высокий уровень мицелиального роста наблюдался только у штамма ЮК-4.

Таким образом, проведенные исследования выявили значительную вариативность изучаемых культур по признаку термотолерантности мицелиального роста. При этом наибольшую лабильность в диапазоне температур от 20 до 30⁰С проявили три штамма (BCu₁-06 и ББК-1). И еще одна культура - ЮК-4 показала относительно высокую термофильность. Здесь следует подчеркнуть, что два из трех указанных штаммов были изолированы из ксирофтных стаций.

4.3 Продуктивность штаммов при глубинном культивировании

Одним из наиболее распространенных способов массовой обработки энтомопатогенных грибов является жидкофазная ферментация.

Опыты по оценке продуктивности тех же пяти штаммов гриба *B. bassiana*, отобранных по признаку вирулентности на саранчовых, в глубинной культуре на среде Сабуро показали, что четыре из пяти изучаемых культур показали достаточно высокую продуктивность (BCu₂₂-07, BD₄-07, ЮК-4 и ББК-1). Для них максимальный титр составил от 5,6 до 9,1х10⁹ blastospores на 1 мл (таблица 4).

Таблица 4 - Продуктивность гриба *B. bassiana* при глубинном культивировании на модифицированной среде Сабуро

Штамм	Титр blastospores $\times 10^8$, сутки посева инокуляции		
	3 сутки	6 сутки	9 сутки
BCu ₁ -06	2,00±1,56	11,10±1,06	48,00±9,03
BCu ₂₂ -07	1,33±0,17	55,73±3,59	91,33±9,34
BD ₄ -07	1,87±0,42	71,20±10,22	36,00±5,51
ЮК-4	0,50±0,08	64,66±3,47	38,66±1,33
ББК-1	39,30±2,16	70,67±0,13	84,67±3,18
НСР _{.05}	2,33	9,80	12,80

При этом для штаммов ВD₄-07 и ЮК-4 максимальная продуктивность наблюдалась на шестые сутки после посева ($7,1$ и $6,4 \times 10^9$ соответственно). К девятому дню титр бластоспор в данном случае существенно снизился. Для двух других культур (ВCu₂₂-07 и ББК-1) максимальные титры бластоспор наблюдались на девятые сутки – $9,1$ и $8,6 \times 10^9$ соответственно, что существенно выше по сравнению с другими штаммами. При этом для эталонного штамма ББК-1 продуктивность на шестой день после инокуляции существенно не различается с культурами, показавшими максимальный прирост к этому сроку.

Таким образом, с точки зрения глубинного культивирования наиболее перспективными являются культуры ВCu₂₂-07 и ББК-1. Кроме того, достаточно технологичными в данном отношении являются также штаммы ВD₄-07 и ЮК-4.

4.4 Продуктивность штаммов при твердофазном культивировании

Сравнительное изучение продуктивности отобранных штаммов в поверхностной культуре проводили на трех видах сыпучих субстратов: пшене, рисе и перловой крупе.

Наибольшая продуктивность конидий на всех испытываемых субстратах и для всех изучаемых культур гриба наблюдалась через две недели после инокуляции. К 21-м суткам произошел существенный спад титра конидий. Максимальный выход конидий наблюдается у эталонного штамма ББК-1 (таблица 5). В этом случае на 14-е сутки после посева в зависимости от вида субстрата выход конидий составил от $1,1 \times 10^9$ до 1×10^{10} с 1 гр., что существенно выше с большинством других испытываемых культур. При этом наибольшая продуктивность для этого штамма наблюдалась при его культивировании на рисе и пшене.

Таблица 5 - Продуктивность штаммов *B. bassiana* при поверхностном культивировании на сыпучих субстратах

Штамм	Титр п $\times 10^9$ /г, в зависимости от субстрата на 14 сутки после посева		
	пшено	перловая крупа	рис
ВCu ₁ -06	$0,76 \pm 0,15$	$0,21 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,18$
ВCu ₂₂ -07	$2,18 \pm 0,31$	$0,46 \pm 0,05$	$0,75 \pm 0,14$
ВD ₄ -07	$0,36 \pm 0,12$	$0,41 \pm 0,15$	$0,63 \pm 0,17$
ЮК-4	$0,88 \pm 0,23$	$0,51 \pm 0,13$	$0,95 \pm 0,07$
ББК-1	$6,41 \pm 1,51$	$1,17 \pm 0,08$	$10,5 \pm 0,91$
НСР.05	0,56	0,69	0,35

Среди новых культур наибольшую продуктивность показал ВCu₂₂-07. Для него выход конидий через две недели после посева на пшене составил $2,2 \times 10^9$ с 1 гр. Для других культур данной выборки продуктивность была существенно ниже.

Таким образом, с точки зрения наработки конидий наиболее продуктивным штаммом является эталонный ББК-1. Среди новых культур максимальная продуктивность наблюдалась у штамма ВCu₂₂-07 (на пшене).

Глава 5 БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБА *BEAUVERIA BASSIANA* ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ САРАНЧОВЫХ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

5.1 Оценка биологической активности водной суспензии конидий

B. bassiana при обработке кулиг в полевых условиях

В 2008 году в ходе мелкоделяночных полевых опытов были проведены эксперименты по оценке вирулентности водной суспензии гифомицетов в отношении личинок 5-го возраста азиатской саранчи в окрестностях г. Уштобе Алматинской области.

Результаты проведенных исследований показали, что во всех вариантах опыта заражение личинок в поле прошло успешно. К 27-му дню после инокуляции уровень смертности хозяина при содержании его в лабораторных условиях (пластиковые контейнеры) составил 96 – 100%. При этом наибольшая скорость гибели саранчи наблюдалась в варианте со штаммом ББК-1 (100% на 15-е сутки).

Таблица 6 - Влияние солнечной инсоляции на активность гриба *B. bassiana* (титр 5×10^7) в отношении личинок 5-го возраста азиатской саранчи при содержании насекомых в садках в полевых условиях (заражение в поле)

Вариант	Освещенность	Смертность %, сутки после обработки				
		13	17	21	25	29
ББК-1	Свет	5,0±2,9	10,0±0,0	10,0±0,0	40,0±11,6	50,0±11,6
	Тень	80,0±11,6	80,0±11,6	90,0±5,8	100	100
Контроль	Свет	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Тень	0,0	0,0	0,0	10,0±5,8	10,0±5,8
НСР ₀₅		13,34	15,89	15,29	22,28	21,64

Анализ данных по уровню смертности саранчи на открытом воздухе (под изоляторами из газовой ткани) показал, что в садках, поставленных в затененном месте, гибель хозяина была существенно выше по сравнению с участком без затенения. При затенении к 25-м суткам после заражения составила 100% (таблица 6). В то же время при интенсивной солнечной инсоляции значение этого показателя к 29-му дню не превышало 50%.

Установлено, что на открытом участке уровень солнечной инсоляции достигает 80 - 100 тыс. люкс, в то время как в условиях затенения значения этого показателя не превышают 4 - 8 тыс. люкс. При этом температура воздуха в первом случае варьировали в пределах от 22 до 45°C, то во втором от 22 до 33°C.

Выявленная закономерность, на наш взгляд, может быть обусловлена следующими обстоятельствами: 1) при высокой инсоляции и температуре происходит гибель конидий, не проникших в полость тела в течение первых 16 часов после заражения; 2) указанные условия тормозят развитие инфекции уже в полости тела хозяина.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при использовании водной суспензии конидий *B. bassiana* на естественном фоне температуры и солнечной инсоляции в условиях Юго-Восточного Казахстана эффективность гриба существенно ниже по сравнению с лабораторными условиями. Это вызывает необходимость поиска различных добавок, выступающих в роли фотопротекторов.

5.2 Влияние растительного масла на биологическую активность гриба *B. bassiana* в полевых условиях

В настоящее время основная препаративная форма микоинсектицидов, применяемых для снижения численности саранчовых, является масляная суспензия конидий грибов, предназначенная для ультромалообъемного опрыскивания (Lomer et al., 2001; Faria, Wraight, 2007).

В связи с этим нами был проведен ряд опытов, направленных на оценку биологической активности данной препаративной формы на основе конидий гриба *B. bassiana* в условиях Юго-Восточного Казахстана.

В ходе первого эксперимента (апрель 2009 г.) оценивали биологическую активность масляной и водной суспензиями конидий гриба (штамм ББК-1; норма расхода - 1×10^{12} /га) на личинках младших возрастов азиатской саранчи.

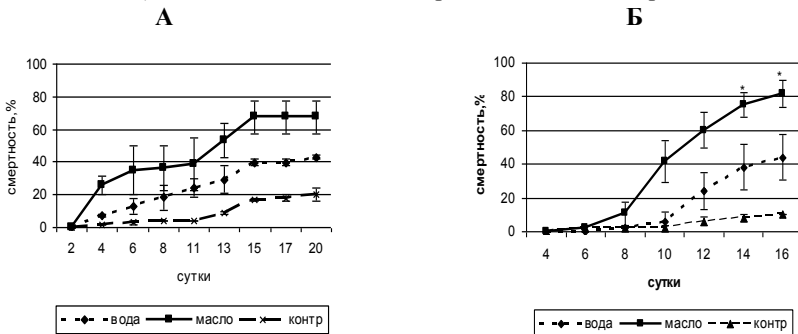


Рисунок 6 - Биологическая активность гриба *B. bassiana* (штамм ББК-1) в на азиатской саранче (А) и комплексе нестадных саранчовых (Б) (Алматинская обл., 2009 г.)

При использовании масляной суспензии патогена уровень смертности личинок вредителя через две недели после обработки при содержании под изоляторами из газовой ткани в полевых условиях составил 75% (рисунок 6 А). В случае с водной суспензией конидий гриба его биологическая активность была существенно ниже (42%).

Аналогичные результаты были получены в том же году при обработке на личинку старших возрастов и имаго комплекса видов нестадных саранчовых. результаты. Здесь смертность вредителей при использовании масляной суспензии к 16-м суткам после обработки достигала 83% (рисунок 6 Б). Для водной суспензии, также как и в предыдущем случае, биологическая активность была существенно ниже и не превышала 44%.

Сравнительный анализ данных второго эксперимента при содержании обработанных насекомых в поле (изоляторы из газовой ткани) и в лабораторных условиях (пластиковые стаканы) показал, что в последнем случае уже на 9-е сутки после заражения все обработанные особи погибли вне зависимости от препаративной формы. Таким образом, результаты данного эксперимента показали, что при полевой обработке с помощью малообъемного опрыскивателя заражение насекомых произошло в 100% случаев.

Однако при размещении обработанных насекомых в полевых условиях (под изоляторами) максимальный уровень смертности наблюдался только на 16-е сутки и не превысил 83%. Причина этого явления кроется, как уже отмечено выше в высоком естественном температурном фоне и действия прямой солнечной инсоляции. Об этом также свидетельствует тот факт, что в полевых условиях водная суспензия гриба также оказалась малоэффективной, а масло сработало в качестве хорошего фотопротектора.

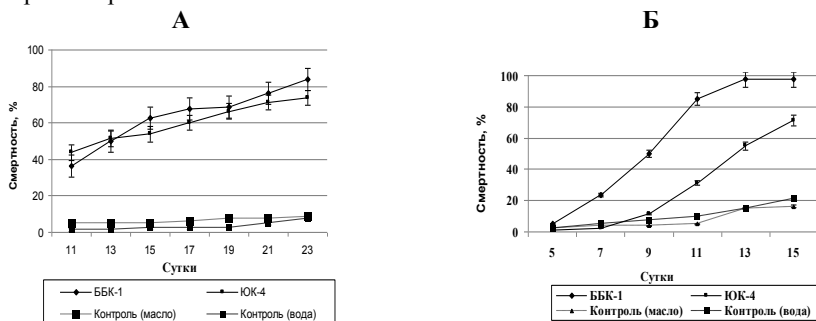


Рисунок 12 - Биологическая активность гриба *B. bassiana* (штаммы ББК-1 и ЮК-4) в отношении личинок азиатской саранчи (А) и пустынного пруса (Б) (Алматинская обл., 2010 г.)

В ходе первого опыта в 2010 году на личинках младших возрастов азиатской саранчи использовали масляную суспензию двух штаммов *B. bassiana* (ЮК-4 и ББК-1). Титре рабочей суспензии 1×10^{12} /га (рисунок 12 А).

При размещении тест-насекомых в садках из газовой ткани итоговый уровень биологической активности составил 83,8 и 73,8% соответственно. При этом само растительное масло (без конидий), не оказывала ни какого токсического действия на личинок саранчи.

Оценка биологической активности масляной суспензии тех же штаммов гриба на личинках младших возрастов пустынного пруса притом же титре рабочей суспензии показала, что смертность этого вида была существенно выше по сравнению с азиатской саранчой. Уже на 13-е сутки после обработки в варианте со штаммом ББК-1 погибло 97,5% особей (рисунок 12 Б).

В 2012 году оценивали биологической активности масляной суспензии уже трех штаммов гриба (ЮК-4, ВСu22-07 и ББК-1) в отношении личинок младших возрастов итальянского пруса при двух нормах расхода 1×10^{12} и 5×10^{12} конидий на гектар (рисунки 13 А и Б).

Все испытываемые культуры в обеих концентрациях показали высокую биологическую активность. На 19-й день после обработки уровень смертности личинок вредителя составил 100%. При этом выявлены существенные различия в динамике гибели в зависимости от титра конидий. При максимальном титре (5×10^{12}) уже на 11-е сутки после заражения вне зависимости от штамма смертность личинок составляла 88,9-98,2%. К этому сроку при более низкой концентрации уровень биологической активности варьировал в пределах от 48,3 до 64,4%. Между всеми тре-

мя штаммами при одинаковых концентрациях различий по динамике биологической активности обнаружено не было. Таким образом, в этом опыте отобранные нами штаммы существенно не отличались от эталона.

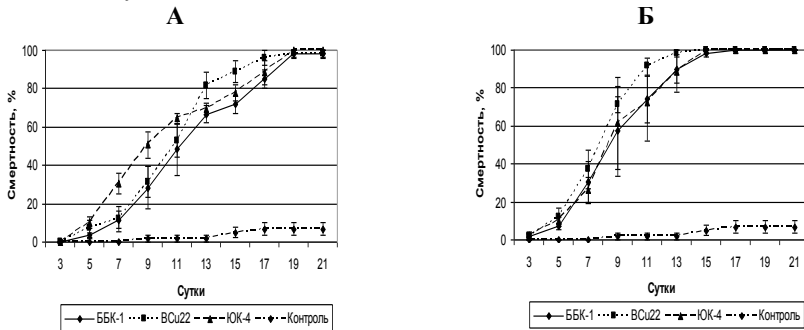


Рисунок 13 - Биологическая активность гриба *B. bassiana* (штаммы ББК-1 и ЮК-4) в отношении личинок итальянского пруса при титрах рабочей суспензии 1×10^{12} конидий/га (А) и 5×10^{12} конидий/га (Б) (Алматинская обл., 2012 г).

В целом, оценивая полученные данные нужно отметить, что использование новых биопрепаратов на основе гриба *B. bassiana* в форме масляной суспензии может быть вполне эффективно для снижения численности саранчовых. Особенно это касается территорий, где использование химических инсектицидов законодательно запрещено (водоохранные зоны, заповедные территории и другие).

ВЫВОДЫ

1. Новые казахстанские штаммы гриба *B. bassiana* показали высокую гетерогенность по признаку вирулентности на азиатской саранче. Из тридцати трех протестированных культур высокую вирулентность показали 46% штаммов, а 37% оказались слабовирулентными. Отобрано пять культур гриба: ВСu₁-06, ВСu₂₂-07, ВСо₆-07, BD₄-07, ЮК-4, показавших лучшие результаты по скорости гибели хозяина.

2. Виды саранчовых обитающие в ксерофитных стадиях (итальянский и пустынный прус, мароккская саранча) обладают повышенной восприимчивостью к микозу по сравнению с мезо- и гигрофилами (азиатская саранча, конек короткокрылый и др.).

3. На личинках азиатской саранчи и пустынного пруса наибольшую биологическую активность показали культуры ВСu₂₂-07, ЮК-4 и ББК-1 при титрах рабочей суспензии 1×10^7 и 5×10^7 . Отобранные культуры гриба обладают широким спектром действия. Они проявляют высокую вирулентность кроме саранчовых на личинках колорадского жука и на ряде видов вредных чешуекрылых.

4. Выявлена высокая степень гетерогенности культур по признаку термотолерантности конидий *B. bassiana* в диапазоне температур от 20 до 35°C. Наибольшую лабильность к повышенным температурам показали штаммы, изолированные из ксерофитных стадий. Температура воздуха оказывает сильное влияние на интенсивность роста гриба в поверхностной культуре. Наибольшей термофильностью

также обладают культуры, выделенные из материала, собранного в условиях сухих степей.

5. Из пяти протестированных культур четыре обладают высокой продуктивностью при глубинной ферментации (ВСу₂₂-07, ББК-1, ВД₄-07 и ЮК-4). С точки зрения твердофазного культивирования лучшим по продуктивности является эталонный штамм ББК-1. Среди новых культур максимальный выход конидий наблюдалась у культуры ВСу₂₂-07. Оптимальным субстратом для поверхностного культивирования являются пшено и рис.

6. Применение отобранных штаммов гриба *B. bassiana* в форме масляной конидиальной суспензии показывает высокую эффективность для снижения численности азиатской саранчи, итальянского и пустынного пруса.

Практические рекомендации

1. Для разработки нового микоинсектицида против вредных саранчовых предлагается использовать штаммы гриба *Beauveria bassiana* ВСу₂₂-07 и ЮК-4.

2. Нарботку указанных штаммов рекомендуется проводить методом поверхностного твердофазного культивирования на рисе или пшене.

3. Для эффективной борьбы с саранчовыми предлагается использование отобранных штаммов в форме масляной суспензии методом малообъемного опрыскивания из расчета 5×10^{12} конидий/га по личинкам младших возрастов.

Основные материалы диссертации опубликованы в работах:

Статьи, опубликованные в российских рецензируемых журналах

1. Леднев Г.Р. Способы применения энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* для снижения численности саранчовых/ Г.Р. Леднев, М.В. Левченко, В.Ю. Крюков, О.Н. Ярославцева, П.В. Барашкова, **А.М. Успанов**, А.О. Сагитов, В.В. Глулов, В.А. Павлюшин // Иммунология, аллергология, инфектология. -2010. -№ 1. - С. 113-114.

2. Леднев Г.Р. Состояние и перспективы использования микоинсектицидов для снижения численности саранчовых/ Г.Р. Леднев, М.В. Левченко, В.Ю. Крюков, П.В. Митковец, О.Н. Ярославцева, **А.М. Успанов**, В.А. Павлюшин // Защита и карантин растений. -2012. -№6. -С. 18-21.

Статьи, опубликованные в прочих научных журналах и сборниках

3. Леднев Г.Р. Подходы к созданию новых микоинсектицидов и разработке стратегии их применения в защите растений для аридных зон/ Г.Р. Леднев, В.Ю. Крюков, М.В. Левченко, **А.М. Успанов**, А.О. Сагитов, В.В. Глулов, В.А. Павлюшин // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. -2011. -№43. - С. 132-136.

4. **Успанов А.М.** Термотолерантность и продуктивность новых природных изолятов гриба *Beauveria bassiana*, перспективных для снижения численности саранчовых/ **А.М. Успанов**, А.С. Каменова, Н.Д. Слямова, А.Б. Бельгибаева, М.В. Левченко, Г.Р. Леднев // Вестник КазНУ. Серия биологическая. -2010. -№2(44). - С. 91-94.

5. Смагулова Ш.Б. Биологическая эффективность полупрепаративной формы на основе штамма гриба *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. против личинок колорадского жука / Ш.Б. Смагулова, А.А. Нусипбекова, А.В. Лукина, Н.Д. Слямова, **А.М. Успанов**, Б.А. Дуйсембеков // Биологические науки Казахстана. - 2012. - С. 84-89.

6. **Успанов А.М.** Биологическая эффективность химических препаратов и препаративной формы энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. против саранчовых на юго-востоке Республики Казахстан / **А.М. Успанов**, А.С. Динасилов, Г.Р. Леднев, Ж.Б. Ниязбеков // Вестник КазНУ. Серия биологическая. - 2012. - №3(55). - С. 33-36.

Материалы научных конференций

7. Леднев Г.Р. Проблемы и перспективы использования энтомопатогенных грибов против саранчовых / Г.Р. Леднев, М.В. Левченко, В.Ю. Крюков, П.В. Барашкова, О.Н. Ярославцева, **А.М. Успанов**, А.О. Сагитов, В.В. Глузов, В.А. Павлюшин // Материалы 8 Межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока с участием зарубежных ученых. Новосибирск: -2010. -С. 281-282.

8. Леднев Г.Р. Скрининг штаммов гриба *Beauveria bassiana* по вирулентности на колорадском жуке / Г.Р. Леднев, Ш.Б. Смагулова, А.С. Каменова, **А.М. Успанов**, М.В. Левченко, П.В. Барашкова, О.Н. Ярославцева В.Ю. Крюков // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию со дня организации РУП «Институт защиты растений» «Интегрированная защита растений: стратегия и тактика». Минск: -2011. -С.

9. **Успанов А.М.** Влияние температуры воздуха на прорастание конидий высоковирулентных штаммов гриба *Beauveria bassiana*/ **А.М. Успанов**, Б.А. Дуйсембеков, М.В. Левченко, Г.Р. Леднев // Сборник научных трудов «Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности. Ульяновск: -2011. - С. 83-85.

10. **Успанов А.М.** Биологическая активность гриба *Beauveria bassiana* в полевых условиях Казахстана / **А.М. Успанов**, М.В. Левченко, Б.А. Дуйсембеков, Г.Р. Леднев // Материалы международной молодежной конференции «Инфекционная патология членистоногих». Санкт-Петербург: -2012. - С. 70-72.

11. Леднев Г.Р. Чувствительность внутривидовых форм насекомых к возбудителям микозов / Г.Р. Леднев, Б.А. Борисов, Левченко М.В., **А.М. Успанов**, П.В. Митьковец // Материалы 14-го Съезда Русского энтомологического общества. Санкт-Петербург: -2012. - С. 242.

12. Леднёв Г.Р. Особенности скрининга энтомо- и нематопаразитических грибов для снижения численности вредителей растений / Г.Р. Леднёв, Б.А. Борисов, П.В. Митьковец, Д.С. Конурова, **А.М. Успанов** // Современная микология в России. Том 3. Материалы 3-го Съезда микологов России. Москва: Национальная академия микологии. - 2012. - С. 344.

13. Лукина А.В. Поиск насекомых с признаками микоза в нижнегорьях Джунгарского Алатау и выделение новых изолятов энтомопатогенных грибов / А.В. Лукина, Н. Сейткали, А. Адилханкызы, Е.М. Макаров, Е.Ж. Баймагамбетов, **А.М. Успанов** // 2-ая Международная научная конференция молодых ученых «Актуальные проблемы защиты и перспективы карантина растений». Алматы-Рахат: - 2012. - С. 203-205.

14. **Успанов А.М.** Оценка специфичности высоковирулентных для саранчовых штаммов гриба *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. в отношении насекомых из других систематических групп / **А.М. Успанов**, А.С. Каменова, Б.А. Дуйсембеков // 2-ая Международная научная конференция молодых ученых «Актуальные проблемы защиты и перспективы карантина растений». Алматы-Рахат: - 2012. - С. 234-236.

15. Скендиров Д.К. Морфофизиологические особенности перспективных изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria Bassiana* (Blas.) Vuill. / Д.К. Скендиров, А. Бельгибаева, **А.М. Успанов**, Б.А. Дуйсембеков // 2-ая Международная научная конференция молодых ученых «Актуальные проблемы защиты и перспективы карантина растений». Алматы-Рахат: - 2012. - С. 216-219.

16. Скендиров Д.К. Оценка термотолерантности новых казахстанских штаммов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. / Д.К. Скендиров, **А.М. Успанов**, А.С. Каменова, Б.А. Дуйсембеков, А.О. Сагитов // 2-ая Международная научная конференция молодых ученых «Актуальные проблемы защиты и перспективы карантина растений». Алматы-Рахат: - 2012. - С. 214-216.

17. **Успанов А.М.** Оценка продуктивности новых перспективных изолятов гриба *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. / **А.М. Успанов**, М.В. Левченко, А.С. Каменова, Д.К. Скендиров, Б.А. Дуйсембеков, Г.Р. Леднев // 2-ая Международная научная конференция молодых ученых «Актуальные проблемы защиты и перспективы карантина растений». Алматы-Рахат: - 2012. - С. 216-219.

Патент

18. Сагитов А.О. Инновационный патент №26599 на изобретение. Штамм гриба *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ЮК₄ – 09 для получения биопрепарата против саранчовых. / А.О.Сагитов, Б.А. Дуйсембеков, В.Ю. Крюков, Е.Ж. Баймагамбетов, Н.Д. Слямова, Ш.Б. Смагулова, **А.М. Успанов** // Государственный реестр изобретений Республики Казахстан: 2012.

