

15. Meissner E. G., Bennett J. E., Qvarnstrom Y., da Silva A., Chu E. Y., Tsokos M., Gea-Banacloche J. Disseminated microsporidiosis in an immunosuppressed patient // *Emerg. Infect. Dis.* 2012. V. 18 (7). P. 1155–1158.
16. Nylund S., Nylund A., Watanabe K., Arnesen C. E., Karlsbakk E. *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a Life Cycle in the Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*) // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2010. V. 57 (2). P. 95–114.
17. Senderskiy I. V., Timofeev S. A., Seliverstova E. V., Pavlova O. A., Dolgikh V. V. 2014. Secretion of *Antonospora* (*Paranosema*) locustae proteins into infected cells suggests an active role of microsporidia in the control of host programs and metabolic processes. *PLoS One.* Apr 4;9(4):e93585. doi: 10.1371/journal.pone.0093585.
18. Solter L. F., Hajek A. E. Control of gypsy moth, *Lymantria dispar*, in North America since 1878. Use of microbes for control and eradication of invasive arthropods. New York: Springer, 2009.
19. Tokarev Y. S., Levchenko M. V., Naumov A. M., Senderskiy I. V., Lednev G. R. Interactions of two insect pathogens, *Paranosema locustae* (Protista: Microsporidia) and *Metarhizium acridum* (Fungi: Hypocreales), during a mixed infection of *Locusta migratoria* (Insecta: Orthoptera) nymphs // *J. Invertebr. Pathol.* 2011. V. 106. P. 336–338.
20. Tokarev Y. S., Sokolova Y. Y. Cellular immune reactions of orthopteran insect host to microsporidia // *Folia Parasitol.* 2005. V. 52. P. 12–13A.
21. Vossbrink C. R., Debrunner-Vossbrinck B. A. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations // *Folia Parasitologica.* 2005. V. 52. P. 131–142.
22. Weiser J. Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten // *Monogr. Angew. Entomol.* 1961. V. 17. P. 1–149.

О. Г. Томилова, В. Ю. Крюков,  
О. Н. Ярославцева, М. В. Тюрин,  
И. М. Дубовский, Н. А. Крюкова, В. В. Глупов  
Институт систематики и экологии животных СО РАН  
г. Новосибирск, Россия  
e-mail: toksina@mail.ru

## РАЗВИТИЕ МИКОЗОВ И ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ ЛИЧИНОК КОЛОРАДСКОГО ЖУКА НА ФОНЕ ИНТОКСИКАЦИИ АВЕРМЕКТИНАМИ

Микозы насекомых широко распространены в природе и играют важную роль в регуляции их численности. По этой причине именно энтомопатогенные грибы (р. *Beauveria* и *Metarhizium*) одними из первых стали использоваться в практике защиты растений. Однако грибные энтомопатогены характеризуются высокой зависимостью от условий среды (солнечная радиация, температура, влажность), растянутым инкубационным периодом болезни, нестабильной вирулентностью пропагул при длительном культивировании на питательных средах.

В настоящее время показана большая перспективность разработки комбинированных препаратов на основе смесей энтомопатогенных грибов с бактериями или вторичными метаболитами растений и грибов [1–3]. Использование комбинированных препаратов позволяет эффективно сдерживать численность

фитофагов, минимизировать потери урожая защищаемых культур.

В качестве активного компонента в смеси с энтомопатогенными грибами могут выступать синтезированные или природные авермектины [4–6]. Взаимодействие энтомопатогенных грибов с авермектинами обеспечивает стабильный энтомоцидный эффект и позволяет рассматривать данную композицию как одну из наиболее перспективных. Однако изменения защитных реакций насекомых при комплексном воздействии на них грибов и авермектинов не изучалось. Соответственно, вопросы о причинах возможного синергизма между грибами и авермектинами остаются открытыми.

Одним из важнейших объектов микробиологического контроля среди насекомых-фитофагов является колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say.). По уровню численности и вредоносности его относят к числу супердоми-

нантных вредоносных видов [7]. Формирование резистентности к большинству инсектицидов [8] обуславливает необходимость поиска эффективных методов биологического контроля численности колорадского жука.

Целью настоящей работы являлось исследование воздействия *Metarhizium robertsii* на личинок колорадского жука на фоне интоксикации авермектинами. Помимо показателей гибели и веса насекомых, оценивали изменения клеточного и гуморального иммунитета, а также состояние детоксицирующей системы насекомых в ходе патологического процесса.

Для инфицирования насекомых использовали культуру P-72 *Metarhizium robertsii*. В экспериментах применяли промышленный препарат Актарофит 0,2 % («Энзим», г. Винница) на основе комплекса природных авермектинов (Аверсектин С), продуцируемых *Streptomyces avermitilis*. Оценку влияния актарофита на *M. robertsii* проводили с использованием методики агаровых блоков, в качестве питательной среды (ПС) – SDAY. Личинок колорадского жука IV возраста содержали в вентилируемых пластиковых контейнерах объемом 300 мл по 10 экз. при 25 °С, 80–90 %-ной относительной влажности, 12-часовом световом дне, кормили листьями картофеля. В опытных вариантах проводили перкутанную обработку личинок погружением в исследуемую суспензию и через обработанный корм. Смертность и массу насекомых учитывали на протяжении 10 сут. В каждом варианте опытов было использовано не менее 30 насекомых (три повторности по 10 личинок).

Показатели клеточного иммунитета и биохимического статуса опытных насекомых оценивали в динамике в течение 3 суток после обработки. Активность неспецифических эстераз (ЭСТ) и глутатион-S-трансферазы (ГСТ) в лимфе и жировом теле личинок колорадского жука, а также фенолоксидазную активность (ФО) в лимфе и кутикуле насекомых определяли спектрофотометрически [9, 10].

Для оценки показателей клеточного иммунитета проводили подсчет общего числа гемоцитов и типирование клеток по фиксированным окрашенным мазкам [10].

В предварительных экспериментах было установлено, что полулетальная концентрация

(ЛК<sub>50</sub>) актарофита для личинок IV возраста колорадского жука составляет 0,0054, это в 40 раз ниже минимальных рекомендуемых производителем препарата рабочих концентраций против данного объекта.

Оценка ингибирующей активности биопрепарата актарофит на культуру гриба *M. robertsii* показала, что в концентрации рекомендованной для применения (0,2 %) актарофит вызывал замедление мицелиального роста гриба на 30–35 % (3–5 сутки). В последующие сутки ингибирующее действие препарата частично нивелировалось. В полулетальной концентрации (0,005 %) ингибирующего действия актарофита на гриб не было отмечено.

Выбор оптимального титра *M. robertsii* в смеси с авермектинами проводили в диапазоне от  $5 \times 10^3$  до  $7,5 \times 10^5$  спор/мл, оптимальным для применения в смеси с полулетальной концентрацией актарофита оказался титр  $5 \times 10^5$  спор/мл. Данная комбинация обеспечивала синергетический эффект смеси с 3 по 10 сутки с высокой степенью достоверности.

Микроскопическое исследование и посев гемолимфы зараженных личинок на ПС показали, что формирование бластоспор *M. robertsii* в гемоцеле под воздействием совместного инфицирования опережает грибную моноинфекцию на 2 суток, достоверное превышение количества бластоспор при комбинированной обработке зарегистрировано на 5–7 сутки. Скорость гибели насекомых также значительно увеличивалась, ЛТ<sub>50</sub> при комбинированной обработке сократилась в 2,2 раза по сравнению с грибной моноинфекцией. Отмечено снижение подвижности и значительное отставание в развитии личинок под действием авермектинов и при комбинированной обработке.

Нами зафиксировано повышение активности ФО в лимфе, и особенно в кутикуле инфицированных личинок на 3 сутки с момента заражения. Максимальный эффект получен под действием совместного применения исследуемых компонентов. Вероятно, повышенное содержание ФО при смешанной обработке обусловлено ускорением течения микозного патогенеза под действием авермектинов.

Выявлены изменения состояния детоксицирующей системы личинок колорадского жука в эксперименте. Воздействие авермекти-

нов в чистом виде, и особенно в смеси с грибом, вызывало на 3 сутки активацию экспрессии ГСТ и неспецифических эстераз в лимфе насекомых, что может быть вызвано наличием токсических компонентов тестируемых агентов, а также токсичных продуктов эндогенного происхождения, сопровождающих патологический процесс. Изменение активности детоксицирующих ферментов отмечено и в жировом теле. Воздействие актарофита и комбинации агентов вызвало на 3 сутки достоверное увеличение содержания ГСТ в гомогенате жирового тела, хотя грибная моноинфекция в этот период не вызывала подъема ГСТ. Достоверное снижение количества неспецифических эстераз в жировом теле отмечено под воздействием гриба и особенно его смеси с авермектинами, что свидетельствует о снижении защитных реакций, обеспечивающих дегидратацию ксенобиотиков.

Общее число гемоцитов резко увеличилось в варианте с грибной моноинфекцией, тог-

да как под действием авермекинов или комбинированной обработки не наблюдалось подъема общей численности клеток. Тем не менее структура гемоцитов под действием авермектинов изменялась – отмечено существенное снижение иммунокомпетентных клеток-гранулоцитов.

Таким образом, развитие микоза личинок колорадского жука, вызванного *M. robertsii*, на фоне токсического воздействия полулетальных концентраций авермектинов протекает в более сжатый срок, сопровождается изменением иммунного ответа насекомых на грибную инфекцию, что приводит к усугублению патологического процесса и быстрой гибели насекомых. Стратегия использования грибной инфекции в сочетании со сниженными дозами микробных метаболитов, в частности Аверсектина С, может быть перспективным подходом для подавления численности колорадского жука.

#### Список литературы

1. Wraight S. P., Ramos M. R. Integrated use of >3.84 *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *tenebrionis* for microbial biocontrol of Colorado potato beetle. Journal of Anhui Agricultural University. 2007. Vol. 34. P. 174–184.
2. Kryukov V. Yu., Khodyrev V. P., Yaroslavtseva O. N., Kameneva A. S., Duisembekov B. A., Glupov V. V. Synergistic action of entomopathogenic hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the infection of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. Vol. 45. P. 511–516.
3. Krukov V. J., Martemyanov V. V., Polovinka M. P., Luzina O. A., Dubovskiy I. M., Serebrov V. V., Hodirev V. P., Malarchuk A. A., Gerber O. N., Jaroslavceva O. N., Bojarisheva E. A., Levchenko M. V., Glupov V. V., Salakhutdinov N. F., Tolstikov G. A. Usnic acid – promising synergist for biopesticide containing entomopathogenic microorganisms // Doklady Biological Sciences. 2008. Vol. 423, № 2. P. 279–282.
4. Anderson T. E., Hajek A. E., Roberts D. W., Preisler H. K., Robertson J. L. Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Effects of Combinations of *Beauveria bassiana* with Insecticides // J. of Economic Entomology. 1989. Vol. 82, № 1. P. 83–89.
5. Shternshis M., Tsvetkova V. Comparison of some preparations for the control of Siberian population of Colorado beetle // Inf. Bull. EPRS IOBC. 2007. № 37. P. 21–24.
6. Asi M. R., Bashir M. H., Afzal M., Ashfaq M., Sahi S. T. Compatibility of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides // Pakistan J. Bot. 2010. Vol. 42. P. 4207–4214.
7. Павлюшин В. А., Сухорученко Г. И., Фасулати С. Р., Вилкова Н. А. Колорадский жук: распространение, экологическая пластичность, вредоносность, методы контроля // Приложение к журналу «Защита и карантин растений». 2009. № 3. 32 с.
8. Alyokhin A., Baker M., Mota-Sanchez D., Dively G., Grafius E. Colorado potato beetle resistance to insecticides // Amer. J. Potato Res. 2008. Vol. 85. P. 395–413.
9. Dubovskiy I. M., Slyamova N. D., Kryukov V. Yu., Yaroslavtseva O. N., Levchenko M. V., Belgibaeva A. B., Adilkhankyzy A., Glupov V. V. The activity of nonspecific esterases and glutathione-S-transferase in *Locusta migratoria* larvae infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales) // Entomological Review. 2012. Vol. 92, № 1. P. 27–32. URL: [http://eco.nsc.ru/labpat/dubovskiy/pdf/Dubovskiy\\_2012.pdf](http://eco.nsc.ru/labpat/dubovskiy/pdf/Dubovskiy_2012.pdf).
10. Kryukov V., Yaroslavtseva O. N., Dubovskiy I. M., Tyurin M. V., Kryukova N. A., Glupov V. V. Insecticidal and immunosuppressive effect of ascomycete *Cordyceps militaris* on the larvae of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // Biology Bulletin. 2014. Vol. 41, № 3. P. 276–283.

O. G. Tomilova, V. Yu. Kryukov, O. N. Yaroslavtseva,  
M. V. Tyurin, I. M. Dubovskiy,  
N. A. Kryukova, V. V. Glupov

Institute of systematics and ecology of animals SB RAS,  
Novosibirsk  
e-mail: toksina@mail.ru

## MYCOSIS DEVELOPMENT AND IMMUNE REACTIONS OF COLORADO POTATO BEETLE LARVAE IN THE PRESENCE OF INTOXICATION BY AVERMECTINS

**Summary.** The treatment by avermectins led to increasing susceptibility of Colorado potato beetle larvae to the fungal infection (*Metarhizium robertsii*). Application of entomopathogenic fungi and complex of natural avermectins together caused

synergetic effect. Changes of insect's immune status and impairment of pathological process during mycosis have been registered in presence of toxicogenic half-lethal concentrations of avermectins.

М. А. Томошевич

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН  
г. Новосибирск, Россия  
e-mail: arysa9@mail.ru

## НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПАТОКОМПЛЕКСОВ ЛИСТЬЕВ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ИНТРОДУКЦИИ В СИБИРИ

Данная работа посвящена выявлению закономерностей формирования патоконплексов при интродукции древесных растений в Сибири. Многолетние исследования осуществлялись в дендрариях Центрального Сибирского ботанического сада СО РАН, Института леса им. В. Н. Сукачева (ИЛ) СО РАН (г. Красноярск), Института садоводства им. Лисавенко и Южно-Сибирского ботанического сада (г. Барнаул) и в различных городских посадках (скверы, парки, бульвары, магистрали и др.) городов Новосибирск, Красноярск, Кемерово, Барнаул и Томск. В течение 1997–2012 гг. было обследовано около 300 видов древесных листопадных растений.

Фитопатологические обследования растений-интродуцентов и аборигенов позволили выявить 121 вид листовых патогенных микромицетов, относящихся к 2 отделам, 14 порядкам, 46 родам. Наибольшее число видов относится к отделу Ascomycota (86,8 %). Из отдела Basidiomycota из патогенных микромицетов отмечены представители порядка Russiniales и агарикоидный гриб *Chondrostereum purpureum*.

Установлено, что наибольшее число патогенов развивается на аборигенных растениях (от 19 до 60 видов, что составляет 66–75 % от всех обнаруженных микромицетов) (табл. 1). На интродуцентах североамериканского и дальневосточного происхождения фиксируется от 1 до 7 грибов (до 13 % от общего числа). На европейских интродуцентах встречается от 4 до 16 патогенных микромицетов, что составляет 13–20 % от общего числа.

Анализируя устойчивость интродуцентов, можно отметить, что североамериканские виды, как и дальневосточные, поражаются в основном грибами-полифагами (*Coryneum foliicola*, *Leptoxyphium fumago*, *Cladosporium herbarum* и др.) или широкораспространенными патогенами (*Blumeriella jaarii*, *Erysiphe adunca*, *Mycosphaerella populi*, *Cronartium ribicola*, *Phragmidium tuberculatum*, *Stigmia carpophila*, *Cercospora rosicola* и др.). На европейских растениях и некоторых дальневосточных зафиксированы патогены, развивающиеся в «своих» регионах. Так, три патогена зафиксировано из дальневосточного региона (*Cercospora gotoana*, *Phyllosticta phellodendricola*, *Gloeosporium berberidis*) и