

На правах рукописи



Крюков Вадим Юрьевич

**АДАПТАЦИИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ АСКОМИЦЕТОВ
(ASCOMYCOTA, HYROSCREALES) К НАСЕКОМЫМ-ХОЗЯЕВАМ И
ФАКТОРАМ СРЕДЫ В УСЛОВИЯХ КОНТИНЕНТАЛЬНОГО
КЛИМАТА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И КАЗАХСТАНА**

03.02.08 – Экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Томск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук в лаборатории патологии насекомых.

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Глунов Виктор Вячеславович

Официальные оппоненты:

Штерншис Маргарита Владимировна, доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный аграрный университет», (г. Новосибирск), кафедра защиты растений, профессор

Атаев Геннадий Леонидович, доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена» (г. Санкт-Петербург), кафедра зоологии, заведующий кафедрой

Пономарев Василий Иванович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук (г. Екатеринбург), лаборатория лесовосстановления, защиты леса и лесопользования, заведующий лабораторией

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится 22 апреля 2015 года в 10-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.267.10, созданного на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36 (корпус НИИ ББ).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» www.tsu.ru.

Автореферат разослан « ____ » февраля 2015 г.

Материалы по защите диссертации размещены на официальном сайте ТГУ:
http://www.tsu.ru/content/news/announcement_of_the_dissertations_in_the_tsu.php

Ученый секретарь диссертационного совета

Просекина Елена Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Энтомопатогенные аскомицеты широко распространены в наземных экосистемах и способны вызывать гибель насекомых-хозяев в энзоотическом или эпизоотическом масштабах. Эволюция этих организмов привела к существованию групп с разными типами размножения: телеоморфных грибов, в жизненном цикле которых всегда присутствует половая стадия, и анаморфных, у которых данная стадия образуется крайне редко и локально, либо полностью утрачена. Последних ранее относили к формальному отделу Deuteromycota (=Anamorphic fungi). В настоящее время широкое использование молекулярно-генетических методов приводит к таксономическому объединению анаморфных и телеоморфных видов и родов (Sung et al., 2007). Однако эти две группы грибов демонстрируют принципиальные различия в их экологии. В частности, для анаморфных форм (*Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*) характерны все признаки деспециализации: широкий спектр насекомых-хозяев, космополитическое распространение, эвритопность, факультативно-сапротрофное питание, возможность развития в ризосфере или внутренних тканях растений (Ownley et al., 2010; Behie et al., 2012). Напротив, телеоморфные грибы (*Cordyceps*, *Ophiocordyceps* и др.), как правило, стенотопны, имеют ограниченный спектр хозяев, локальное распространение, характеризуются более сложными, длительными жизненными циклами и облигатным паразитизмом.

В настоящее время в мире регистрируется мощный всплеск работ, посвященных энтомопатогенным грибам. Большинство из них сосредоточены на биологии широко-специализированных представителей анаморфных родов *Metarhizium* и *Beauveria* (обзоры: Zimmermann, 2007; Wraight et al., 2007a; Vidal, Fargues et al., 2007; Vega et al., 2009; Bruck et al., 2010; Meyling, Hajek, 2010; Sandhu et al., 2012; Wang, Feng, 2014 и др.). Значительно меньшее число публикаций посвящено биологии телеоморфных грибов. Весьма слабо изучена экология этих видов, жизненные циклы, факторы вирулентности. Между тем известно, что телеоморфные виды могут выступать основными регуляторами численности ряда растительноядных насекомых (Kamata, 1998, 2000). Однако в литературе почти нет сведений об их эпизоотической значимости, а для территорий Западной Сибири и Казахстана такие данные отсутствуют. Вероятно, это отсутствие интереса связано с

трудностью разработки грибных препаратов в виду сложности культивирования телеоморфных грибов и их более сложным характером взаимоотношений с хозяевами. До сих пор слабо изучен жизненный цикл и трофические связи даже одного из наиболее распространенных видов телеоморфных грибов *Cordyceps militaris* (Shrestha et al., 2012). Существуют спорадические работы по влиянию культуральных сред, экстрактов и метаболитов *C. militaris* на насекомых (Kim et al., 2002), но их роль в патогенезах остается невыясненной. Метаболиты данного гриба активно исследуются в медицине для создания фармацевтических препаратов, но их использование для контроля численности насекомых отходит на второй план.

Один из ключевых вопросов в изучении энтомопатогенных грибов – формирование специализации к определенным таксонам хозяев. Наиболее вероятное направление эволюции паразитических форм связано с прогрессивной дифференциацией и специализацией, при этом морфофизиологические преобразования паразитов (от проникновения в организм до супрессии иммунных реакций и молекулярной мимикрии) связаны с приспособлениями к определенным хозяевам. В ряде случаев показано, что некоторые виды анаморфных грибов (*Beauveria brongniartii*, *Metarhizium acridum*, *M. album*, *M. majus*) или их патоварианты проявляют высокий уровень вирулентности только к определенным таксонам насекомых (Humber, 1997; Wang et al., 2009; Gao et al., 2011 и др.). Известно, что данная специализация связана с композицией эпикутикулярных соединений хозяев, которые обуславливают возможность адгезии и прорастания спор гриба на покровах насекомых, а также с протеинами грибов, выполняющими рецепторные функции (G-белки) и ферментами, гидролизующими кутикулу (St. Leger et al., 1994; Charnley, 2003; Wang, St. Leger, 2005; Jarrold et al., 2007; Hu et al., 2014). Также, показано, что специализация сопряжена с уровнем токсинообразования у грибов (Kershaw et al., 1999; Amiri-Besheli et al., 2000), но данное явление слабо изучено. Так, предполагается, что эволюция внутри анаморфных родов (*Metarhizium*) была направлена на деспециализацию (расширение круга хозяев) и повышение уровня токсинов (Hu et al., 2014). У видов р. *Metarhizium* специализированные формы обладают более низким уровнем деструксинов *in vitro*, чем генералисты. Ряд авторов (Борисов, 1990; Воронина, 1997; Kershaw et al., 1999; Charnley, 2003) выделяют два типа стратегий у энтомопатогенных грибов: стратегию роста (или биотрофная стратегия) и стратегию токсина

(или токсигенная стратегия). Для первой характерна относительно длительная биотрофная фаза с последующим образованием склероциев внутри погибших насекомых и обильным формированием дочерней инфекции конидий гриба. Для второй стратегии характерна быстрая гибель хозяев, связанная с опережающим токсическим эффектом, при этом гриб погибает вместе с хозяином, не успев колонизировать его гемоцель. Причины формирования токсигенной стратегии у грибов до конца не раскрыты. Слабо изучены взаимоотношения токсигенных и биотрофных штаммов с хозяевами разных таксонов, особенности их сапротрофного развития, их взаимодействия друг с другом и с сопутствующей микробиотой насекомых. Практически не исследованы ответные физиологические реакции насекомых при инфицировании культурами с разными патогенными стратегиями.

Важно отметить, что для большей части видов и штаммов в родах *Beauveria*, *Metarhizium* никакой специализации к определенным таксонам хозяев не обнаружено (Rehner, Buckley, 2005; Wang et al., 2005; Meyling et al., 2009). Эволюция этих грибов привела к тому, что они могут поражать насекомых самых разных отрядов. Соответственно, возникает вопрос: какова цена этой широкой специализации? Известно, что для эффективного заражения хозяев анаморфами требуются очень высокие инфекционные нагрузки, составляющие тысячи, десятки и даже сотни тысяч конидий на одну особь (Ment et al., 2010; Jaronski, 2010; Dubovskiy et al., 2013b). Такими высокими дозами хозяева не могут часто контаминироваться в природе (Борисов и др., 2001), в особенности, в условиях засушливого климата Сибири и Казахстана. Однако показано, что эти дозы могут быть значительно снижены под влиянием ряда факторов среды, таких как, субоптимальные для хозяев температуры, экранирование УФ, присутствие у насекомых сопутствующих инфекций, воздействие природных или синтетических инсектицидов (Furlong, Groden, 2001; Thomas et al., 2003; Wraight, Ramos, 2005; Inglis et al., 2007 и др.). Механизм действия этих факторов не всегда очевиден: влияют ли они непосредственно на гриб или же на хозяина. Мы полагаем, что в данном случае важнейшее значение имеет организм насекомого, который под действием этих факторов не может в должной мере обеспечить защиту от грибов. Вероятно, данные факторы могут влиять на ряд защитных систем и реакций, связанных с устойчивостью к грибным патогенам. К ним относятся, в частности, свойства эпикутикулы, ингибирующие или стимулирующие прорастание спор гриба; активность одного из ключевых

ферментов иммунной системы фенолоксидазы, направленной на меланизацию патогена в кутикуле и гемоцели; реакции клеточного иммунитета, обуславливающие заключение гифальных тел гриба в капсулу; активность ферментов детоксицирующей системы, направленных на инактивацию метаболитов, образующихся при микозе (Hajek, St. Leger, 1994; Глухов и др., 2001; Cerenius, Soderhall, 2004; Серебров и др., 2006; Zibae et al., 2009). В связи с этим, мы предполагаем взаимосвязь между воздействием факторов среды, защитными реакциями насекомых и специализацией патогенов.

В приспособлении к хозяину важнейшую роль играют не только адаптации паразита к организму хозяина, но и к тем экологическим условиям, которые его окружают (Догель, 1962). В последние годы выдвигается гипотеза о том, что в дифференциации близких видов и внутривидовых форм анаморфных энтомопатогенных грибов ведущую роль могли играть адаптации не непосредственно к хозяевам, а к их среде обитания, то есть к определенным растительным ассоциациям, диапазонам температуры и влажности и др. (Bidochka et al., 2001, 2002, 2005; Wyrebek et al., 2011; Wyrebek, Bidochka, 2013). Например, показана высокая эффективность селекции энтомопатогенных грибов по принципу устойчивости к высокой температуре (De Cracy et al., 2009). В этом плане равнинные территории Западной Сибири и Казахстана представляют уникальный регион для исследования гигротермических предпочтений популяций микроорганизмов, поскольку на данной территории идеально выражена широтная зональность и ей свойственна высокая сохранность естественных ландшафтов (Сляднев, 1965; Мордкович, 2014). Данное исследование весьма актуально и с прикладной точки зрения, поскольку эффективность грибных препаратов в тех или иных природных зонах значительно зависит от гигротермических предпочтений штаммов продуцентов (Vidal, Fargues, 2007). Особенно важен поиск штаммов грибов активных в широком диапазоне гигротермических условий, поскольку они могут быть использованы для разработки биопрепаратов, высокоэффективных в условиях континентального климата.

Исходя из вышеизложенного, **цель** данной работы: анализ адаптаций энтомопатогенных аскомицетов к насекомым-хозяевам, оценка влияния биотических и абиотических факторов на популяции грибов, течение микозов и защитные реакции насекомых в условиях континентального климата Западной Сибири и Казахстана.

Задачи:

1. Изучить распространение и диапазон хозяев доминирующих телеоморфных и анаморфных форм энтомопатогенных грибов в условиях Западной Сибири и Казахстана, оценить их эпизоотическое значение.

2. Исследовать вирулентные и морфолого-культуральные свойства изолятов *Beauveria bassiana* s.l., выделенных из насекомых различных систематических групп и селектированных по принципу вирулентности к различным хозяевам.

3. Изучить морфо-физиологические свойства штаммов *Metarhizium robertsii* с токсигенной и биотрофной стратегиями, а также защитные реакции насекомых при инфицировании данными культурами.

4. Исследовать течение микозов, вызванных *Cordyceps militaris*, при инфицировании насекомых разных систематических групп, оценить влияние культуральных сред и отдельных метаболитов гриба на развитие насекомых, их клеточный и гуморальный иммунитет, а также восприимчивость к вторичным инфекциям.

5. Установить температурные преферендумы популяций *Beauveria bassiana* из разных широтных зон Сибири и Казахстана, оценить их вирулентные свойства в условиях разных гигротермических режимов.

6. Установить температурные преферендумы грибов рода *Metarhizium*. Оценить их вирулентные свойства в условиях континентального климата Западной Сибири.

7. Изучить развитие микозов и защитные реакции хозяев под влиянием температур оптимальных и субоптимальных для насекомых.

8. Изучить особенности течения микозов у насекомых под влиянием сопутствующих бактериальных инфекций *Pseudomonas* sp., *Bacillus thuringiensis* и парализации эктопаразитоидами *Habrobracon hebetor*.

9. Оценить восприимчивость насекомых к грибам *Beauveria*, *Metarhizium* под влиянием синтетических и полусинтетических инсектицидов. Разработать рекомендации по созданию комбинированных биопрепаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Широкая специализация анаморфных энтомопатогенных грибов сопряжена с поражением ими особей, ослабленных биотическими и абиотическими факторами: субоптимальные температуры, сопутствующие инфекции, яды перепончатокрылых, инсектициды.

Перечисленные факторы вызывают подавление защитных реакций насекомых, связанных с устойчивостью к грибным патогенам.

2. Специализация энтомопатогенных грибов *Metarhizium* по отношению к хозяевам проявляется не только в биотрофной, но и в некротрофной стадии жизненного цикла грибов, что связано с возможностью завершать жизненный цикл только на определенных группах насекомых. Снижение уровня конидеообразования на насекомых, вплоть до полной элиминации гриба, характерно для токсигенных культур, вызывающих резкое подавление клеточного иммунитета и активацию ферментов гуморальной и детоксицирующей систем насекомых.

3. Прогрессивная дифференциация у широко-специализированных грибов *Beauveria bassiana* в условиях Западной Сибири и Казахстана связана с адаптациями к абиотическим факторам среды, нежели к определенным таксонам хозяев. С понижением широты местности у популяций *B. bassiana* увеличивается термотолерантность и вирулентность в аридных условиях. Поэтому именно степные штаммы наиболее перспективны для регуляции численности насекомых в условиях континентального климата.

4. Для разработки эффективных микоинсектицидных препаратов целесообразно введение в их состав природных или синтетических компонентов, задерживающих процессы линьки и метаморфоза, подавляющих реакции клеточного, гуморального иммунитета и активность ферментов детоксицирующей системы насекомых.

Научная новизна. Впервые описаны эпизоотии, вызванные грибами р. *Cordyceps* в популяциях летне-осеннего комплекса дефолиантов лиственных деревьев. Выявлены новые для территории Сибири и России виды энтомопатогенных аскомицетов. Установлено, что внутри вида *Metarhizium robertsii* существуют формы с разными патогенными стратегиями: биотрофной и токсигенной, которые вызывают различный ответ реакций клеточного, гуморального иммунитета и детоксицирующей системы насекомых. Показано, что токсигенные культуры могут поражать насекомых разных отрядов, но образовывать конидиальное спороношение они способны только на определенных хозяевах. Впервые установлено, что под воздействием метаболитов *Cordyceps militaris* у насекомых происходит нарушение пролиферации гемоцитов, изменение уровня фенолоксидазы в гемолимфе и кутикуле, задержка развития и повышение

их восприимчивости к грибу *B. bassiana*. Показано, что дифференциация популяций *B. bassiana* в Западной Сибири и Казахстане зависит, преимущественно, от природно-зональных факторов. В широтном градиенте данной территории в направлении север-юг у популяций данного гриба увеличивается толерантность к повышенной температуре. Показано, что именно степные штаммы *B. bassiana* являются наиболее вирулентными в условиях высоких температур и пониженной влажности. Выявлен ряд экологических различий между криптоическими видами р. *Metarhizium* и показано, что *M. robertsii* наиболее адаптирован к континентальным условиям. Выявлен ряд сочетаний штаммов грибов и бактерий, а также энтомопатогенов и инсектицидов, которые приводят к синергистическому эффекту в смертности саранчовых, чешуекрылых и колорадского жука. Показано, что под воздействием субоптимальных для насекомых температур, сопутствующих инфекций, ядов перепончатокрылых, растительных и синтетических инсектицидов, у насекомых происходит изменения композиции эпикутикулярных липидов, подавление реакций клеточного и гуморального иммунитета, а также ферментов детоксицирующей системы, что сопряжено с резким увеличением чувствительности насекомых к грибам *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*. Впервые показана возможность горизонтального переноса энтомопатогенных грибов эктопаразитоидами.

Практическая значимость. Разработаны новые экологически безопасные подходы для регуляции численности насекомых–фитофагов на основе сочетания штаммов микроорганизмов, проявляющих синергистическое действие: энтомопатогенных грибов *Metarhizium robertsii* и бактерий *Bacillus thuringiensis morissoni* var. *tenebrionis*, а также грибов *Beauveria bassiana* и фторированных модификантов усниновой кислоты. Получены термотолерантные высоковирулентные штаммы грибов, перспективные для биологического контроля насекомых в условиях континентального климата. Разработан ряд новых методов культивирования плодовых тел гриба *Cordyceps militaris*. Полученные данные могут быть использованы для мониторинга состояния популяций насекомых – фитофагов и их патогенов, а также в курсах лекций по энтомологии, микологии, паразитологии, экологии и защите растений.

Апробации. Материалы диссертации прошли апробацию на конференциях: «Лесопатологическая обстановка в лесном фонде Уральского региона» (Екатеринбург, 2001), II Всероссийском съезде по

защите растений (Санкт-Петербург, 2005), VII и VIII Межрегиональных совещаниях энтомологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2006, 2010), международной конференции «Актуальные проблемы защиты и карантина растений» (Алматы, 2006), XV Европейском микологическом конгрессе (Санкт-Петербург, 2007), XIII и XIV съездах Русского энтомологического общества (Краснодар, 2007; Санкт-Петербург, 2012), V и VI съездах паразитологического общества РАН (Санкт-Петербург, 2008; Новосибирск, 2013), Всероссийских конференциях «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке» (Новосибирск, 2009), «Фундаментальные проблемы энтомологии в XXI веке» (Санкт-Петербург, 2011), «Болезни и вредители в лесах России: век XXI» (Екатеринбург, 2011), «Инфекционная патология членистоногих» (Санкт-Петербург, Пушкин, 2012), Междисциплинарном микологическом форуме (Москва, 2010), III съезде микологов России (Москва, 2012), Международном симпозиуме «Биологический контроль инвазивных организмов» (Сербия, Златибор, 2009), 45- и 46-м ежегодных конгрессах по патологии беспозвоночных животных (Аргентина, Буэнос-Айрес, 2012; Германия, Майнц, 2014), межлабораторных семинарах ИСиЭЖ СО РАН (2007, 2013).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы достаточно полно отражены в 41 опубликованной работе, в том числе 27 статей в научных журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертаций (из них 13 статей в журналах, входящих в библиографическую базу Web of Science), 3 патента (2 патента Российской Федерации, 1 патент Республики Казахстан), 11 публикаций в прочих периодических изданиях.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 249 страницах текста, включает введение, 6 глав, заключение, выводы и приложения. Работа иллюстрирована 69 рисунками и 16 таблицами. Список литературы включает 380 источников, из которых 248 на иностранных языках.

Личный вклад соискателя. Исследование патогенезов насекомых, изучение экологических и морфо-физиологических свойств энтомопатогенов, обработка и анализ данных проведены непосредственно автором. Видовая идентификация энтомопатогенов на основе

молекулярно-генетических маркеров проведена совместно с лабораторией эпигенетики Института цитологии и генетики (ИЦиГ СО РАН). Хроматографические исследования вторичных метаболитов грибов и эпикутикулярных липидов насекомых проводились совместно с лабораторией физиологически активных веществ Института органической химии им. Н.Н. Ворожцова (НИОХ СО РАН) и отделом прикладной энтомологии университета Суонси (Великобритания).

Благодарности. За помощь на разных этапах исследований я признателен своему руководителю д.б.н. В.В. Глупову, всему коллективу лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН и, в особенности, к.б.н. О.Н. Ярославцевой, а также всем сотрудникам лаборатории биотехнологии НИИЗиКР (г. Алматы), Б.А. Борисову (ИПЭЭ РАН) и к.б.н. Г.Р. Ледневу (ВИЗР РАСХН). За консультативную помощь я глубоко признателен к.б.н. Ф.Б. Ганнибалу, д.б.н. Ю.С. Токареву (ВИЗР РАСХН), проф. Т.М. Бутт (ун-т Суонси, Великобритания) и д.б.н. В.Г. Мордковичу (ИСиЭЖ СО РАН). Неоценимый вклад в организацию и проведение экспериментальной работы внесли к.б.н. М.В. Левченко (ВИЗР), к.б.н. Е.А. Елисафенко, д.б.н. С.М. Закиян (ИЦиГ СО РАН), к.б.н. В.А. Шило (ИСиЭЖ СО РАН), к.б.н. О.А. Лузина, к.б.н. М.П. Половинка, д.б.н. Н.Ф. Салахутдинов (НИОХ СО РАН), д.б.н. Г.В. Беньковская, Е.В. Сурина (ИБиГ УНЦ РАН), Н.Н. Веснина (НГПУ), А.Е. Кухаренко (ГосНИИ Генетика), А. Абдула и К. Фикен (ун-т Суонси). За помощь в идентификации бактерий, грибов и насекомых я признателен к.б.н. В.П. Ходыреву, д.б.н. А.А. Легалову, д.б.н. М.Г. Сергееву, д.б.н. А.Г. Бугрову, к.б.н. С.В. Василенко, к.б.н. И.И. Любечанскому, к.б.н. В.С. Сорокиной, (ИСиЭЖ СО РАН), к.б.н. И.А. Горбуновой (ЦСБС СО РАН), д.б.н. Е.С. Попову (БИН РАН), за предоставленные образцы – к.б.н. А.В. Александровой (МГУ), д.б.н. А.В. Баркалову (ИСиЭЖ СО РАН). Работа выполнена при финансовой поддержке фондов Президиума СО РАН, РФФИ, Президента РФ, ФЦП, МОН РК и мэрии г. Новосибирска.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор энтомопатогенных грибов проводился в Новосибирской, Курганской, Семипалатинской, Алматинской областях и Алтайском крае. Также в работе использован материал с севера Тюменской области, Горного Алтая, Красноярского края, Бурятии, различных регионов европейской части бывшего СССР, Приморья, Северного Ирана, Южного

Вьетнама. Всего в природе собрано и детектировано до рода или вида свыше 500 экземпляров энтомопатогенных грибов. В экспериментальной работе использовано 85 изолятов (54 *Beauveria*, 12 *Metarhizium*, 17 *Cordyceps*, 2 *Isaria*).

Выделение, хранение, культивирование грибов проводили по общепринятым методикам (Новикова, Бойкова, 2001; Butt, Goettel, 2000). Идентификацию культур *Beauveria*, *Isaria* осуществляли методом световой микроскопии, а грибов *Metarhizium* и *Cordyceps* на основе секвенирования региона 5' EF-1 α (Sung et al., 2007; Bischoff et al., 2009). Морфолого-культуральные свойства грибов и антагонизм между грибами и бактериями изучались общепринятыми микробиологическими методами. Уровень токсинов грибов (кордицепин, деструксины В, Е) определялся с помощью ВЭЖХ (Kershaw et al., 1999; Крюков и др., 2012). Температурные преферендумы грибов изучали методом измерения радиального роста колоний, культивируемых при 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 и 37°C и выражали в относительных единицах (%) в пересчете на размер колоний при оптимальной температуре, взятый за 100%. Для анализа генетических различий изолятов из разных регионов, а также природных и селектированных культур, были использованы межмикросателлитные ДНК маркеры (ISSR) (Estrada et al., 2007).

В экспериментальной работе использованы насекомые из природных популяций колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say, саранчовых *Locusta migratoria* L., *Calliptamus barabarus* Costa, *Dociostaurus* sp., чешукерылых *Yponomeuta malinellus* Zell., *Aglais urticae* L., *Operophtera* sp., *Malacosoma parallela* Staud., *Lymantria dispar* L., *Euproctis similis* Fuessly, *Hуphantria cunea* Dr., а также лабораторные насекомые: огневка *Galleria mellonella* L., габробракон *Habrobracon hebetor* Say, муха *Protophormia terranova* R.-D., хрущак *Tenebrio molitor* L., бронзовка *Pachnoda marginata* Drury, сверчок *Gryllus bimaculatus* Deg., таракан *Nauphoeta cinerea* Oliv. Всего в экспериментах использовано свыше 30000 особей насекомых.

Биотестирование осуществляли методом перкутанного, интрагемоцеллюлярного и перорального заражения насекомых (Butt, Goettel, 2000), при содержании последних в вентилируемых контейнерах или чашках Петри. В полевых экспериментах проводили обработку участков площадью 15 м², либо использовали содержание насекомых в садках-рукавах. Контроль микроклимата в экспериментах осуществляли с помощью датчиков температуры и влажности, помещенных в контейнеры

или садки с насекомыми. Все эксперименты ставили не менее чем в трех повторностях. Учеты смертности, веса, линьки проводили в течение 10–20 суток. В каждом варианте биотестов участвовало от 30 до 100 насекомых.

Исследование уровня адгезии грибов на кутикуле насекомых проводилось методом смыва конидий дихлорметаном, с последующим осаждением, и подсчетом в гемоцитометрах (Ment et al., 2010a). Уровень прорастания конидий на кутикуле *in vivo* определялся методом флуоресцентной микроскопии (Butt, 1997), а время появления грибов в гемоцеле – методом посева гемолимфы на искусственные питательные среды (ИПС) (Dubovskiy et al., 2013b). Определение состава жирных кислот эпикутикулы проводили путем их экстракции гексаном и последующей масс-спектрометрией. Определение уровня прорастания конидий на полярных и неполярных экстрактах кутикулы и жирных кислотах проводили по методике Ment et al. (2010b). Изучение особенностей формирования плодовых тел и продуктивности конидиеобразования на трупах проводились по методикам Sato, Shimazu (2002), Butt, Goettel (2000) и др.

Общее число гемоцитов и их отдельных типов в гемолимфе насекомых определяли методом световой микроскопии (Глулов и др., 2001). Интенсивность процесса инкапсуляции определяли путем введения в гемоцель насекомых нейлоновых имплантантов и последующей оценкой степени их потемнения с помощью программы Image Pro (Dubovskiy et al., 2011). Фенолоксидазную (ФО) активность в плазме гемолимфы и кутикуле насекомых определяли спектрофотометрически по образованию меланина при длине волны 490 нм (Ashida, Soderhall, 1984). Активность неспецифических эстераз оценивали спектрофотометрически по образованию нитрофенила при длине волны 410 нм, по методу Prabhakaran et al. (1995). Активность глутатион-S-трансфераз (ГСТ) определяли спектрофотометрически по образованию 5-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, при длине волны 340 нм, по методу Habig et al., 1974 с изменениями (Дубовский и др., 2011). Активность ферментов выражали в единицах изменения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка. Концентрацию белка в образцах насекомых определяли по методу М. Бредфорда (1976).

Данные по продуктивности грибов, уровню прорастания конидий, росту колоний, биомассе, уровню токсинов, ферментативной активности патогенов, а также смертности и иммунитету насекомых проанализированы с помощью t-теста, One Way, либо Factorial ANOVA с

использованием критерия Тьюки. При анализе процентных значений проводили предварительное преобразование процентов в $\sqrt{\arcsin}$. Для расчета показателей летального времени использовали тест Каплана – Майера, а для расчета полулетальных концентраций – тест Спирмена – Кербера. Для анализа аддитивных и синергистических взаимодействий патогенов использован биномиальный тест, основанный на сравнении ожидаемого и наблюдаемого уровня смертности (Tounou et al., 2008). Расчеты выполнены с использованием программ Microsoft Excel 2003, STATISTICA 6.0, TSK, Sigma-Stat 3.

Терминология. В работе приняты следующие термины. **Телеоморфные формы** (= телеоморфные виды, грибы) – грибы, в жизненном цикле которых обязательно присутствует половая стадия (телеоморфа), а бесполое (анаморфное) спороношение самостоятельно не встречается в природе (Борисов и др., 2001; Gams et al., 2012). **Анаморфные формы** (= анаморфные виды, грибы) – грибы, размножающиеся бесполым путем, их половая стадия (телеоморфа) либо не обнаружена, либо встречается крайне редко и локально (Борисов и др., 2001; Gams et al., 2012). **Биотрофная фаза** – период, при котором происходит развитие гриба на/в хозяине от момента заражения до его смерти (Vega et al., 2009). **Некротрофная фаза** – период развития гриба в/на хозяине после его смерти (Vega et al., 2009). **Токсигенная стратегия** (=стратегия токсина) – стратегия патогена, при которой наблюдается высокая выработка токсинов и относительно быстрая смертность хозяина от токсикоза; при этом гриб не всегда способен образовать спороношение на погибшем хозяине (Kershaw et al., 1999; Charnley, 2003). **Биотрофная стратегия** (=стратегия роста) – стратегия патогена, при которой наблюдается относительно длительная биотрофная фаза с последующим обильным формированием спороношения на погибшем хозяине (Kershaw et al., 1999; Charnley, 2003).

2. АНАМОРФНЫЕ И ТЕЛЕОМОРФНЫЕ ФОРМЫ ГРИБОВ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ДИАПАЗОН ХОЗЯЕВ, ЭПИЗООТИЙНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В главе кратко рассмотрены вопросы происхождения энтомопатогенных грибов от мико- и фитопаразитических аскомицетов. Показана роль утраты телеоморфы в эволюции грибов, как путь деспециализации, приводящий к биологическому прогрессу. Рассмотрены основные экологические и физиологические различия между

анаморфными и телеоморфными формами. В частности, для анаморф – это космополитичность, эвритопность, широкий круг хозяев, дополнительное питание в ризосфере и внутренних тканях растений, короткий жизненный цикл. Для телеоморфных – локальное распространение, стенотопность, ограниченный диапазон хозяев, облигатный паразитизм, длительный жизненный цикл.

2.1. Анаморфные грибы

Абсолютным доминантом среди выделенных образцов был морфовид *Beauveria bassiana* s.l., стабильно встречающийся в самых разных биоценозах от тундр и лесотундр до разнотравных и опустыненных степей. В качестве его хозяев нами зарегистрированы насекомые из 7 отрядов и 32 семейств с преобладанием жуков Curculionidae, чешуекрылых Macroheterocera и клопов Pentatomidae. Смертность насекомых от гриба наблюдалась в основном на энзоотическом уровне (Половинко и др., 2010). Второй по численности вид *Isaria farinosa* отмечен от зоны тундр до разнотравных степей, преимущественно на чешуекрылых Macroheterocera или жуках (Coccinellidae, Staphylinidae, Curculionidae). Среди малочисленных анаморф отмечены *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea* и грибы рода *Metarhizium*. Анализ последовательности региона 5' EF-1 α показал принадлежность сибирских популяций *Metarhizium* к *M. robertsii* и *M. flavoviride* var. *pemphigi*.

2.2. Телеоморфные грибы

На территории исследований телеоморфные формы энтомопатогенных грибов зарегистрированы только в северо-восточной части Новосибирской области в мелколиственных и сосново-мелколиственных лесах с хорошо развитым кустарниковым ярусом (пр. *Rubus*, *Sorbus*, *Padus*), высоким травостоем и обилием валежной древесины. Данные станции, по-видимому, обеспечивают необходимые условия для длительного роста стром грибов. Нами отмечены 3 телеоморфных вида: *Ophiocordyceps variabilis*, *Cordyceps militaris* и *Cordyceps bifusispora*. Последние два вида в 2007–2008 гг. в окрестностях г. Болотное вызвали тотальную гибель зимующего запаса куколок чешуекрылых летне-осеннего комплекса филофагов лиственных деревьев (Kryukov et al., 2011). Хозяевами *C. militaris* были не менее 30 видов высших разноусых чешуекрылых (Macroheterocera) из 7 семейств, а также булавоусые пилильщики (Hymenoptera, Cimbicidae). Доминирующими поражёнными видами были хохлатка *Leucodonta bicoloria* и пяденица *Semiothisa notata*. Второй вид *Cordyceps bifusispora*

поражал только куколок совковидок (Thyatiridae) р. *Tetheella*, *Ochropacha* и *Tethea*.

В ряду лет (2007–2012 гг.) наблюдалось одновременное сокращение численности грибов, гусениц в кронах берёз и снижение уровня дефолиации древостоев. Это согласуется с данными, полученными другими авторами в Японии на хохлатке *Syntipistis punctatella* (Kamata, 1998) и в Литве на коконопряде *Dendrolimus pini* (Гедминас, 2013). Авторами показано, что всплеск инфекций, вызванных *S. militaris*, наблюдается в фазе максимума численности филлофагов и в период разреживания.

Проведенные наблюдения согласуются с представлением о том, что специализированные энтомопатогены в большей степени зависят от плотности своих хозяев и обладают более высоким эпизоотическим потенциалом, по сравнению с факультативными, низко-специализированными формами (Cory, Ericsson, 2010; Boomsma et al., 2014). В данной работе впервые описаны эпизоотии, вызванные грибами р. *Cordyceps*, в популяциях филлофагов летне-осеннего комплекса. Полученные факты говорят, что в Сибири в ряде стаций северной лесостепи данные грибы могут оказывать значительное воздействие на численность насекомых-филлофагов лиственных деревьев.

3. ТРОФИЧЕСКАЯ СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ И ПАТОГЕННЫЕ СТРАТЕГИИ ГРИБОВ

3.1. Трофическая специализация *Beauveria bassiana*

В лабораторных биотестах показано отсутствие взаимосвязи между происхождением изолятов гриба *B. bassiana* от насекомых различных систематических групп и их вирулентностью по отношению к представителям Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera (Kryukov et al., 2010). В данных экспериментах были использованы 35 изолятов *B. bassiana*, выделенных на территории Новосибирской области. Выяснено, что изолят, обладающий высокой вирулентностью по отношению к насекомым определенного отряда, оказывается в тоже время высоко-активным для насекомых других отрядов. В частности, показана тесная корреляция ($r > 0.74$, $P < 0.0001$) между вирулентностью штаммов по отношению к колорадскому жуку и саранчовым *S. barbarus*, *L. migratoria* (рис. 1). Установлено, что штаммы, выделенные из одного вида насекомого на небольшой площади леса, могут сильно отличаться по вирулентности.

При проведении 6-кратных пассажей штамма Sar-31 через различных хозяев (*G. mellonella*, *T. molitor*, *L. decemlineata*, *L. migratoria*) было установлено, что селекция гриба через определенного хозяина приводит к усилению вирулентности не только к данному хозяину, но и остальным тестируемым насекомым. У всех селектированных культур отмечались однонаправленные изменения морфолого-культуральных признаков: усиление рельефности и пигментации колоний, повышение продуктивности конидий и липолитической активности. Анализ, проведенный с использованием ISSR маркеров, не показал различий между исходной и селектированными культурами.

Полученные данные согласуются с работами Rehner, Buckley (2005), Wang et al. (2005), Meyling et al. (2009), которые при использовании различных молекулярно-генетических маркеров не обнаружили приуроченности филумов *B. bassiana* к определенным таксонам хозяев.

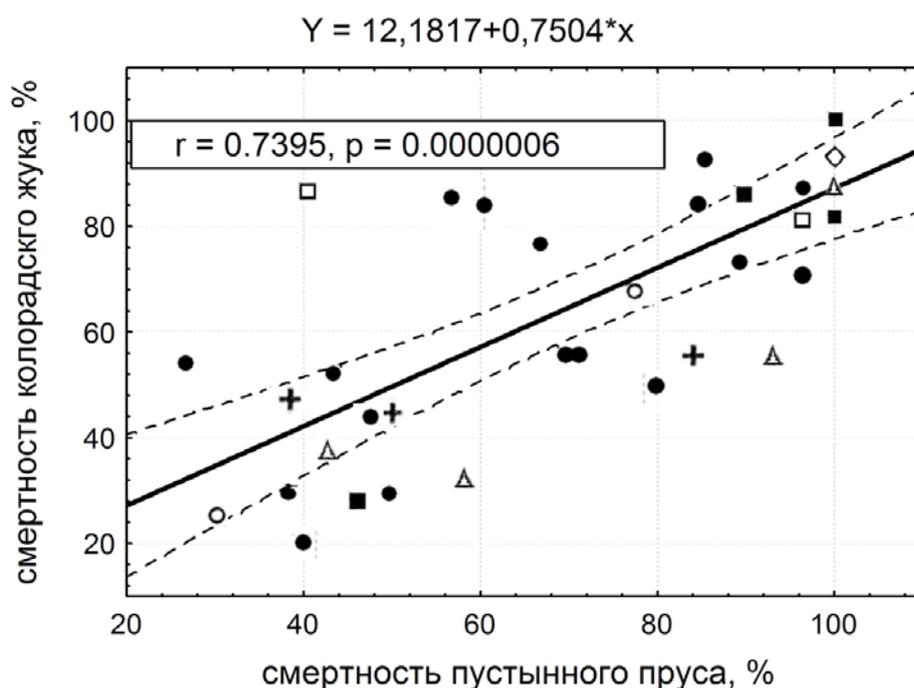


Рис. 1. Смертность личинок пустынного пруса и колорадского жука после заражения изолятами *B. bassiana*, выделенными в Новосибирской области из насекомых разных отрядов. Фигурами показаны источники выделения изолятов: □□ – Orthoptera, Δ – Hemiptera, ◇ – Homoptera, ● – Coleoptera, ■ – Lepidoptera, + – Hymenoptera, ○ – Diptera.

3.2. Трофическая специализация и патогенные стратегии

Metarhizium

3.2.1. Особенности патогенезов и культуральные свойства токсигенного и биотрофного штаммов

При биотестировании культур *Metarhizium* на различных насекомых, нами было обнаружено, что ряд штаммов грибов вызывали микозы, но были не способны образовывать мицелий и конидии на погибших хозяевах. Данный феномен известен в литературе как опережающий токсикоз или стратегия токсина, в противоположность стратегии роста (или биотрофной стратегии), при которой происходит постепенная колонизация гемоцели гифальными телами и последующее спороношение на хозяевах (Воронина и др. 1997; Kershaw et al., 1999). Исследование данных стратегий проводилось на примере двух культур *M. robertsii* P-72 и Мак-1. Штамм Мак-1 (биотрофная стратегия) поражал разные виды саранчовых, жесткокрылых, двукрылых, чешуекрылых, при этом, для него были характерны относительно длительные микозы и обильное спороношение на погибших хозяевах. Для P-72 (токсигенная стратегия) была характерна достоверно более ранняя гибель насекомых, при этом гриб погибал вместе с хозяевами на стадии колонизации насекомых, либо (чаще всего) в некротрофной фазе цикла – после формирования склероциев (Крюков и др., 2011). Трупы при этом колонизировались сопутствующей бактериальной и грибной микробиотой. Завершение жизненного цикла данного штамма наблюдалось только на чешуекрылых (рр. *Galleria*, *Yoponomeuta*, *Limantria*, *Euproctis*), при этом продуктивность конидиеобразования оказывалась ниже, чем у Мак-1.

Установлено, что для P-72 характерен более высокий уровень деструксинов В, Е, более быстрая активация конидий на ИПС и кутикуле насекомых. Важно отметить, что токсигенный штамм был более продуктивен на растительных и синтетических ИПС, тогда как биотрофный – на насекомых и средах, в состав которых входили гомогенаты тела насекомых (Крюков и др., 2011). Последнее свидетельствует о более высокой адаптации Мак-1 к зоотрофному питанию, а P-72 к сапротрофному.

3.2.2 Защитные реакции насекомых при инфицировании токсигенным и биотрофным штаммами

В экспериментах был установлен более выраженный ответ защитных систем хозяина на инфекцию, вызванную токсигенным штаммом на

Таблица 1. Показатели гуморального, клеточного иммунитета и детоксицирующей системы личинок IV возраста колорадского жука на 3 сутки после заражения токсигенным (P-72) и биотрофным (Мак-1) штаммами.

Параметры	Ткани и их составляющие	Варианты		
		Контроль	Штаммы	
			P-72	МАК-1
Фенолоксидазная активность (ΔA490/мин/мг белка)	П [†]	0.061±0.008	0.086±0.012	0.081±0.005
	К	0.012±0.003	0.029±0.007*	0.014±0.003
Интенсивность инкапсуляции (y.e.)	Г	37.45±3.15	26.8±2.01*	32.75±2.88
Общее число гемоцитов (млн/мл)	Г	32.16±4.8	15.09±2.3*	33.58±3.51
Активность неспецифических эстераз (ΔA410/мин/мг белка)	П	0.494±0.05	0.630±0.039*	0.406±0.038
	Ж	12.21±0.51	18.29±1.34*	13.76±1.33
Активность глутатион-S-трансферазы (ΔA340/мин/мг белка)	П	0.018±0.002	0.032±0.003*	0.013±0.002
	Ж	0.089±0.005	0.122±0.011*	0.093±0.008

† - П – плазма гемолимфы, Г – гемолимфа, К – кутикула, Ж – жировое тело, * - P < 0.05 по сравнению с контролем.

начальных этапах микоза (табл. 1). Установлено достоверное повышение уровня ФО в кутикуле при заражении токсигенным штаммом (P-72), что свидетельствует об остром микозе. При инфицировании токсигенным штаммом наблюдалось резкое снижение общего числа гемоцитов и подавление процесса инкапсуляции, достоверное увеличение активности неспецифических эстераз и ГСТ в лимфе и жировом теле насекомых, что может свидетельствовать о выраженном токсикозе. При заражении насекомых биотрофным штаммом (Мак-1), на начальных этапах микоза не наблюдалось достоверных изменений в реакциях иммунной и детоксицирующей систем (табл. 1).

Важно отметить, что гибель грибов вместе с зараженными хозяевами и скудное конидиеобразование на насекомых, отмечалось рядом исследователей именно для токсигенных культур (Борисов, 1990; St. Leger et al., 1996; Kershaw et al., 1999; Pava-Ripoll et al., 2008). Полная утрата способности к формированию спороношения на ряде хозяев у штамма P-72, возможно, связана с автоселекционными или эпигенетическими

процессами, происходящими при культивировании грибов на ИПС. Подобные явления отмечалось для некоторых энтомофторовых грибов (Воронина, 1985, 1997; Воронина и др., 1997). С другой стороны, возможно, в данном случае имеют место не стабилизовавшиеся отношения между патогеном и хозяевами. Так, предполагается, что эволюция внутри рода *Metarhizium* была сопряжена с увеличением уровня токсинов и снижением уровня специализации к хозяевам (Hu et al., 2014). В частности, виды с высокой продукцией деструксинов (*M. robertsii*, *M. anisopliae*) обладают обычно более широкой специализацией, чем виды с низким токсинообразованием (*M. acridum*, *M. majus*, *M. album*) (Kershaw et al., 1999; Wang et al., 2009). Кроме того, именно эволюционно молодые, широко-специализированные виды (*M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. guizhounense*), как правило, обнаруживаются в ризосфере растений (Wyrebek et al., 2011; Fisher et al., 2011), и показывают активный рост на корневых экссудатах (Pava-Ripol, 2013). Исходя из вышеизложенного, вероятно, мы наблюдаем еще не стабилизовавшиеся взаимоотношения в эволюционно молодой системе *M. robertsii* – насекомые-хозяева. Возможно, неспособность к спороношению на ряде насекомых у токсигенных штаммов компенсируется за счет ризосферного развития и способности поражать большое количество разных групп насекомых.

Таким образом, нами установлена внутривидовая дифференциация *M. robertsii* по специализации к хозяевам, патогенным стратегиям, уровню приспособленности к сапротрофному питанию. Проведенное исследование показывает, что специализация у энтомопатогенных грибов проявляется не только в биотрофной, но и в некротрофной фазе жизненного цикла. Общая схема развития патогенов по биотрофному и токсигенному типу представлена на рис. 2.

3.3. Особенности развития микозов, вызванных *Cordyceps militaris*

Как указывалось выше, для телеоморфных грибов характерна слабая изученность путей заражения хозяев и факторов вирулентности. В данной части работы мы исследовали особенности трофической специализации *C. militaris*. Для этого мы использовали различные способы заражения насекомых разными типами спор гриба. Кроме того, оценивали иммуносупрессивное действие культур и отдельных метаболитов на насекомых и их восприимчивость к вторичным инфекциям.

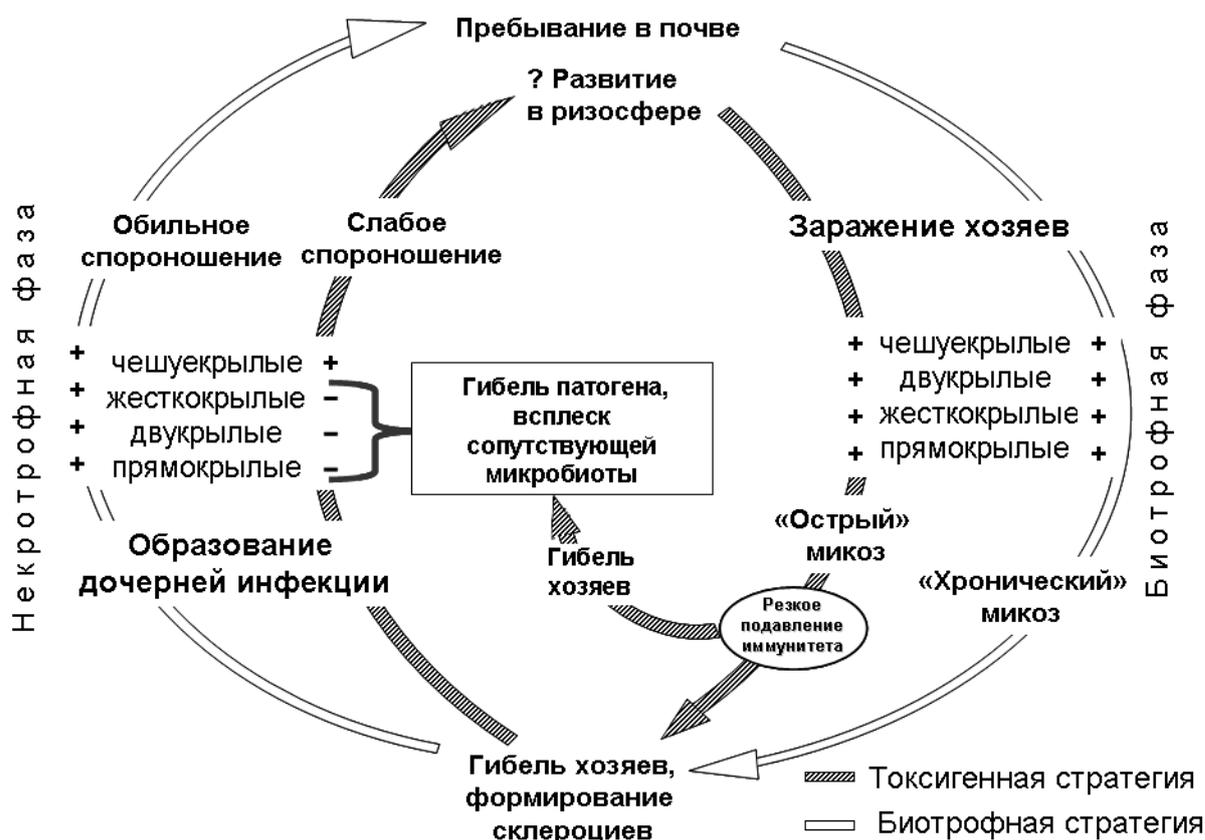


Рис. 2. Развитие микозов по биотрофному и токсигенному типу на примере штаммов Р-72 и Мак-1 (схема).

Пояснение: Биотрофный штамм (внешнее кольцо) заражает насекомых разных отрядов. После длительного микоза происходит гибель хозяев, формирование склероциев, обильное спороношение на трупах и сохранение конидий в среде (почве). Токсигенный штамм (внутреннее кольцо) поражает тех же насекомых, но вызывает скоротечный микоз с резким подавлением иммунитета. После этого на большинстве хозяев патоген гибнет либо до, либо после формирования склероциев, после чего трупы колонизируются сопутствующей микробиотой. Слабое спороношение наблюдается только на чешуекрылых. Снижение численности конидий токсигенного штамма, возможно, компенсируется размножением в ризосфере.

3.3.1. Развитие микозов, вызываемых *Cordyceps militaris*, на неспецифических хозяевах

Методом инъекции в гемоцель насекомых гифальных тел *C. militaris*, выращенных в глубинной культуре, были получены стромы гриба на абсолютно неспецифических хозяевах: сверчке *Gryllus bimaculatus*, бронзовке *Pachnoda marginata* (Крюков и др., 2012b). При перкутанном заражении конидиями отмечена гибель только чешуекрылых (*G. mellonella*, *Malacosoma parallela*, *Operophtera* sp.), при этом на погибших насекомых формировалось только анаморфное спороношение. Таким образом, кутикулярные барьеры играют ведущую роль в

специализации гриба. Кроме того, результаты исследования позволяют предположить, что инфицирование насекомых в природе может осуществляться не только аскоспорами, но и конидиями.

3.3.2. Влияние культуральных сред *Cordyceps militaris* и их отдельных компонентов на насекомых

Выявлено иммуносупрессивное и инсектицидное действие культур *C. militaris* на личинок вошинной огневки и колорадского жука (Крюков и др., 2014). Пероральное действие культуральных сред гриба приводило к дозозависимому снижению выживаемости, отставанию роста, задержке линьки. Кроме того, скармливание культуральных сред *C. militaris* вызывало резкое снижение количества иммунокомпетентных гемоцитов (плазматочитов и гранулоцитов), повышение активности фенолоксидазы в гемолимфе и снижение активности данного фермента в кутикуле, а также повышение чувствительности насекомых к грибу *B. bassiana* на уровне синергистического эффекта. Токсическое действие *C. militaris*, возможно, связано с продукцией кордицепина, способного выступать в качестве терминирующего агента в процессе синтеза нуклеиновых кислот (Holliday, Cleaver, 2008). При тестировании культуральных сред 12 штаммов *C. militaris* на личинках *G. mellonella* нами установлено, что задержка развития зависит от содержания кордицепина в культурах ($r=0.95$, $P<0.00001$). Кроме того, показана остановка развития личинок при инъекциях химически чистого 98% кордицепина. На основе проведенного исследования мы предполагаем, что *C. militaris* характеризуется особой патогенной стратегией, а основное действие его метаболитов связано с ингибирующим воздействием на гемопоэз, а также с нарушением онтогенетических стадий (линька, метаморфоз).

4. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУР НА ПОПУЛЯЦИИ ГРИБОВ И РАЗВИТИЕ МИКОЗОВ

4.1. Температурные оптимумы разных популяций энтомопатогенных грибов

4.1.1. Температурные предпочтения изолятов *Beauveria bassiana* в широтном градиенте Сибири и Казахстана

Показано, что дифференциация популяций *B. bassiana* в Западной Сибири и Казахстане связана с географическими факторами. Так, нами проведено исследование мицелиального роста в диапазоне 5–35°C у изолятов гриба, выделенных в разных природных зонах исследуемых регионов (от 65° до 43° с.ш.) (Крюков и др., 2012с). Выявлено, что с

Рис. 3. Относительный радиальный рост 20 изолятов *Beauveria bassiana* из разных широтных зон Западной Сибири и Казахстана. Л-Т – лесотундра, Л-С – лесостепь, С-С – северная (разнотравно-дерновинно-злаковая) степь Ю-С – южная (опустыненная) степь. Достоверные ($P < 0.05$) отличия: а – от Л-Т; b – от Л-С; с – от С-С; d – от Ю-С.

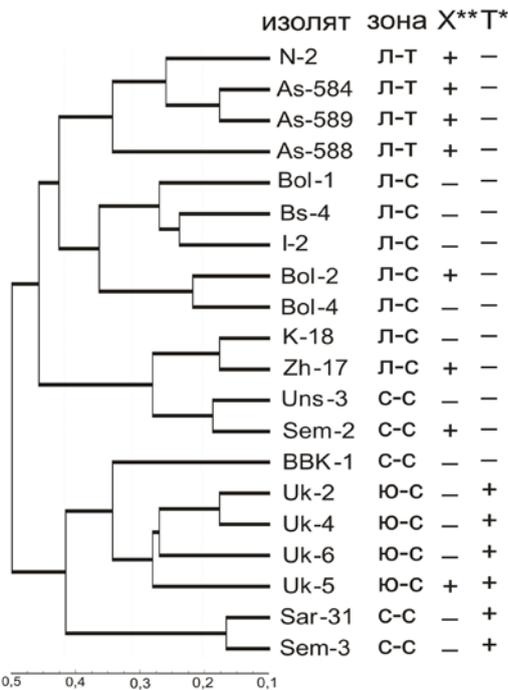
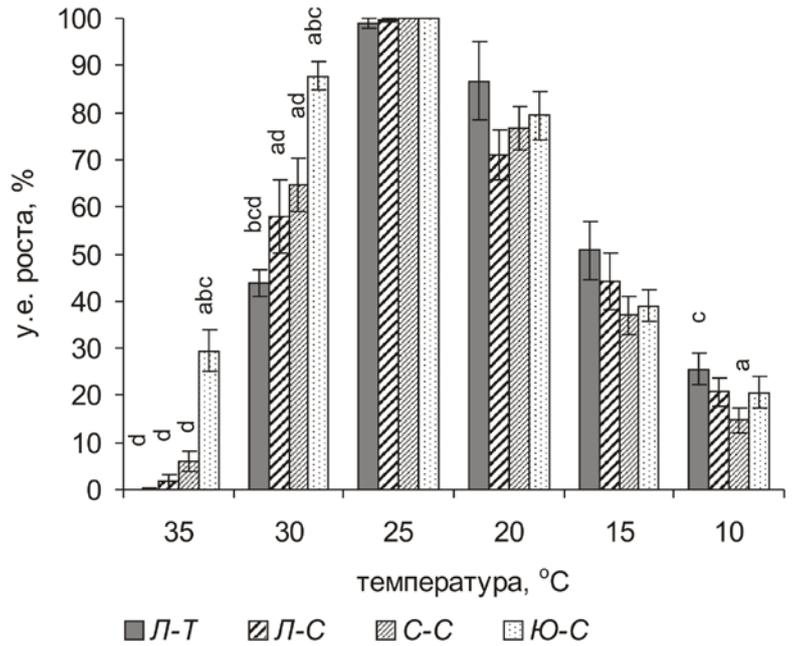
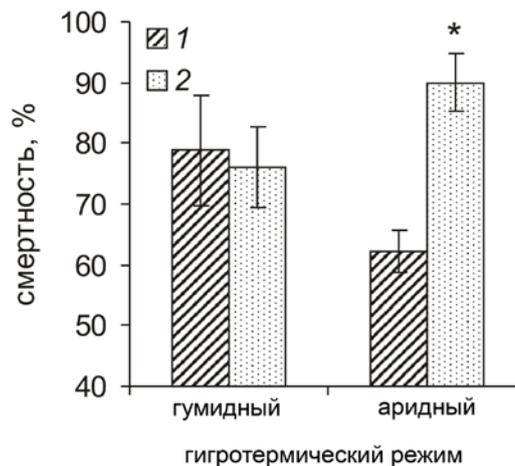


Рис. 4. Дендрограмма генетических связей между изолятами из разных природно-климатических зон Западной Сибири и Казахстана на основе сопоставления профилей 7 ISSR праймеров. Обозначения природных зон как на рис 1. * – Т – толерантность к повышенным температурам (способность к росту при 35°C); ** – X – холодовая активность (рост при 5°C более 1 см за 60 сут.).

понижением широты местности в равнинных условиях у популяций гриба достоверно увеличивается толерантность к повышенным температурам ($r = -0.76$, $P = 0.0001$), что согласуется с хорошо выраженной широтной зональностью исследуемой территории (рис. 3). Изменение в холодной активности культур прослеживалась менее четко, и не было достоверно скоррелировано с широтой местности и теплообеспеченностью регионов. Анализ геномного полиморфизма с использованием мультилокусных межмикросателлитных ДНК-маркеров (ISSR) показал обособленность степных, толерантных к высокой температуре (35°C) изолятов гриба, которые образовали отдельный кластер (рис. 4). Другой блок

Рис. 5. Вирулентность лесостепных (1) и степных (2) изолятов *Beauveria bassiana* по отношению к личинкам *Leptinotarsa decemlineata* при гумидном (22° С, 80%RH) и аридном (30°С, 55%RH) гигротермических режимах. Титр суспензии – 2.5×10^7 конидий/мл, длительность опыта – 10 сут. Гибель в контролях <10%. * – P<0.05.



дендрограммы включил не толерантные к высоким температурам культуры, которые сгруппировались в 3 крупные ветви: лесотундровая, лесостепная и смешанная (лесостепная и северо-степная). В экспериментах на колорадском жуке и вошинной огневке показано, что именно степные изоляты характеризуются наиболее высоким уровнем вирулентности при повышенных температурах и пониженной влажности (рис. 5). Кроме того, способность формировать дочернюю инфекцию на пораженных хозяевах при высоких температурах (33°С) также была характерна только для степных культур (Крюков и др., 2012с). Полученные данные согласуются с представлением о том, что приспособления к определенным гигротермическим условиям играют более важную роль в дифференциации популяций *B. bassiana*, нежели приспособления к определенным хозяевам (Bidochka et al., 2002; Rehner, Buckley, 2005).

4.1.2. Температурные преферендумы штаммов *Metarhizium* и их активность в разных гигротермических режимах

Изучение мицелиального роста штаммов *Metarhizium* в диапазоне температур 10-37°С показало, что культуры *M. robertsii*, *M. guizhounense*, *M. anisopliae* термотолерантны, а *M. brunneum* и *M. flavoviride* var. *remphigi* – психротолерантны. Кроме того, изучена активность штаммов по отношению к личинкам колорадского жука при разных гигротермических режимах: гумидном (22°С и 80%RH), аридном (30°С и 55%RH), а также в условиях естественных суточных колебаний температуры и влажности (3–44°С; 13– 98%RH), характерных для континентального климата (степная зона Новосибирской обл.) в период питания личинок жука. Показано, что наиболее вирулентными при

Табл. 2. Экологические различия между крипточескими видами *M. robertsii* и *M. brunneum*.

Экологические характеристики	<i>M. robertsii</i>	<i>M. brunneum</i>
Способность к заражению хозяев (отряды)	Col., Lep., Orth.*	Col., Lep., Orth.
Ценоотическая приуроченность	лесные, степные, агроценозы	лесные
Температурный оптимум	30°C	25°C или 30°C
Нижний и верхний лимиты роста	15, 37°C	10, 30°C
Вирулентность в гумидных условиях	высокая	средняя, высокая
Вирулентность в аридных условиях	средняя, высокая	низкая, средняя
Спороношение внутри трупов хозяев **	часто	редко

Примечание: * - Col. - Coleoptera, Lep. - Lepidoptera, Orth. – Orthoptera. ** – адаптация, связанная с защитой гриба от УФ и низкой влажности (Lomer et al., 2001; Wraight et al., 2007).

аридном режиме и в естественных условиях являются культуры *M. robertsii*. Выявлен ряд экологических различий между крипточескими видами *M. robertsii* и *M. brunneum* (табл. 2). Полученные результаты сопоставимы с данными Bidochka et al. (2001, 2005), Wyrebek et al. (2011) и согласуются с идеей о том, что *M. robertsii* наиболее адаптирован к открытым местообитаниям. Результаты исследования укладываются в гипотезу «селекции патогенов средой обитания хозяев», согласно которой в дифференциации широко-специализированных представителей *Metarhizium* наиболее важное значение играют адаптации к определенным растительным ассоциациям, а также диапазонам температуры и влажности (Wyrebek et al., 2011; Wyrebek, Bidochka, 2013).

4.1.3. Температурные преферендумы *Cordyceps militaris*

Проведено сравнение температурных преферендумов популяций *C. militaris* из Западной Сибири, Приморья и Европейской части России. Для всех культур оптимум составил 20°C, верхний лимит роста – 27.5°C, при этом наблюдался активный рост при низких температурах 5–10°C. Отмечена крайне низкая вариабельность температурных преференций между разными изолятами *C. militaris*. Культуры из разных регионов имели практически идентичные профили преферендумов, что свидетельствует о стенобионтности данного вида.

4.2. Защитные реакции насекомых при микозах в разных температурных условиях

Эксперименты проведены на личинках *G. mellonella*, содержащихся при оптимальных (34°C) и субоптимальных (24°C) температурах и зараженных грибом *M. robertsii* (штамм P-72). Установлено, что развитие микоза происходит при обоих температурах, но при субоптимальной для хозяев температуре (24°C) чувствительность к грибу возрастает на один порядок (при 34°C $LC_{95} = 10^8$, а при 24°C $LC_{95} = 10^7$ конидий/мл). При субоптимальной температуре в 4–7 раз ($P < 0.001$) увеличивалось содержание пальметиновой, олеиновой и линолевой кислот в эпикутикуле гусениц, повышался в 1.9 раза ($P = 0.005$) уровень адгезии конидий на кутикуле, отмечалась тенденция к более быстрому прорастанию конидий на кутикуле и их проникновению в гемоцель. При оптимальной для насекомых температуре происходило быстрое повышение уровня ФО в кутикуле (6 часов после заражения – стадия адгезии и начала прорастания гриба) с последующим его снижением через 24 и 48 ч. При субоптимальной для насекомых температуре ФО активность повышалась только через 24 или 48 ч после заражения – в период, когда гриб активно развивался в кутикуле и уже проникал в гемоцель. При оптимальной для насекомых температуре не отмечалось изменения в уровне инкапсуляции по сравнению с контролем, тогда как при субоптимальной – происходило достоверное снижение данного показателя.

Анализ прорастания гриба на исследуемых жирных кислотах *in vitro* показал фунгистатические свойства данных соединений. Не исключено, что экскреция данных кислот является защитной реакцией против грибов при субоптимальных температурах. Однако экскреция жирных кислот не способна предотвратить развитие микозов при высоких инфекционных нагрузках.

Проведенный анализ показывает, что при пониженных для *G. mellonella* температурах происходит активация сублетальной грибной инфекции и успешное развитие микозов. Это обусловлено тем, что данные условия не позволяют насекомым в полной мере активировать защитные системы и противостоять патогену (рис. 6), а также более подходящими условиями для роста гриба. Вероятно, субоптимальные температуры, действуя на большой территории, могут служить одной из причин грибных эпизоотий в популяциях насекомых.

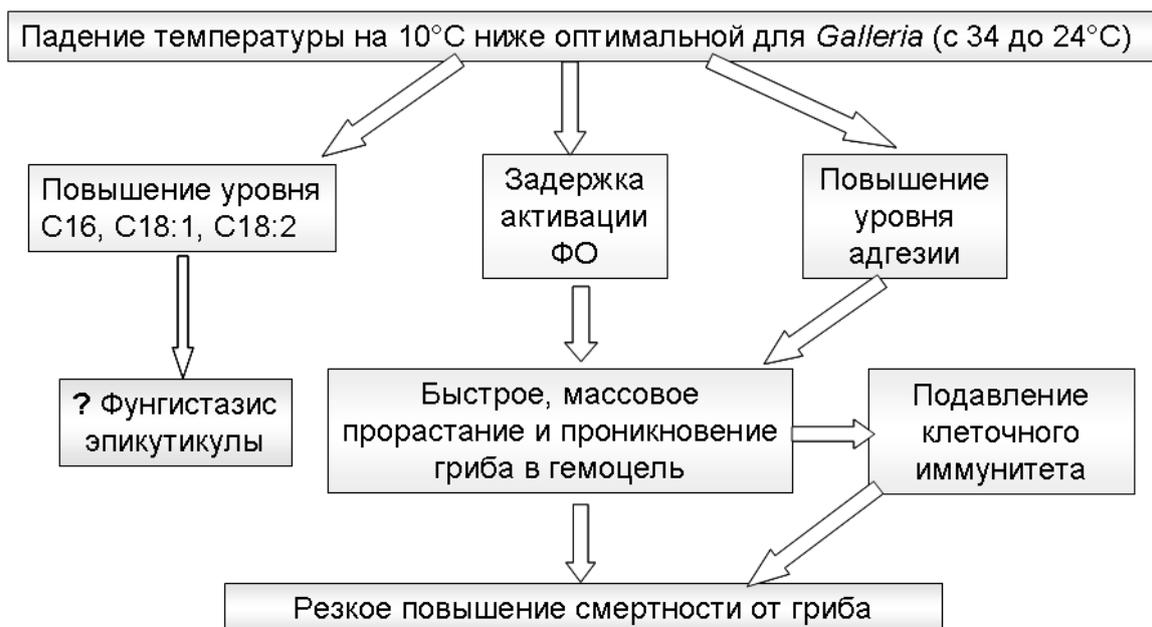


Рис. 6. Изменения в защитных системах и течение микоза в условиях субоптимальной для *Galleria mellonella* температуры (схема).

5. ВЛИЯНИЕ СОПУТСТВУЮЩИХ ИНФЕКЦИЙ И ПАРАЗИТОИДОВ НА РАЗВИТИЕ МИКОЗОВ

Для развития микозов требуются весьма высокие дозы конидий анаморфных грибов, однако гибель насекомых от этих патогенов регистрируется постоянно и стабильно в самых разных биоценозах. Возможно, анаморфные грибы поражают преимущественно насекомых с ослабленным иммунитетом не зависимо от их таксономической принадлежности (Boomsma et al., 2014). Одними из наиболее распространенных факторов, ослабляющих насекомых, являются бактериальные инфекции и паразитоиды.

5.1. Взаимоотношения в системе анаморфные грибы – бактерии *Pseudomonas* – перелетная саранча

Проведен анализ динамики смертности личинок *Locusta migratoria* при синхронном заражении грибами (*B. bassiana* или *M. robertsii*) и бактерией *Pseudomonas* sp., а также исследование микрофлоры погибших от смешанной инфекции насекомых и взаимоотношения патогенов *in vitro* (Леднев и др., 2007а). При сочетании *M. robertsii* и *Pseudomonas* sp. выявлен аддитивный эффект в смертности насекомых, а при сочетании *B. bassiana* и *Pseudomonas* sp. – синергизм. Бактерия подавляла рост гриба *in vitro*. При смешанной инфекции доля трупов, формирующих конидиальное спороношение *B. bassiana*, уменьшалась пропорционально

дозе бактерии, используемой для заражения. Показано, что в погибших насекомых могут сосуществовать оба патогена.

5.2. Синергизм *Bacillus thuringiensis* и *Metarhizium robertsii* при инфицировании колорадского жука

При совместном инфицировании суб- и полулетальными дозами грибов *M. robertsii* и бактерий *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* выявлен синергистический эффект в гибели личинок колорадского жука (Крюков и др., 2009). Синергизм наблюдался при инфицировании младших, средних и старших возрастов личинок жука. Для всех личиночных стадий при бактериальной и смешанной инфекции была характерна остановка роста и задержка окукливания, чего не наблюдалось при микозе. Анализ данных по смертности личинок III возраста показал, что при их инфицировании бактериями LC_{50} конидий гриба уменьшается в 190 раз (с 2.6×10^6 до 1.4×10^4 конидий/мл). Отмечена тенденция к более активному прорастанию конидий и более быстрому проникновению грибов в гемоцель у личинок, зараженных бактериями.

Исследование уровня инкапсуляции при моноинфекциях и смешанном заражении показало, что под действием бактерии происходит резкое снижение активности данного показателя (Ярославцева и др., 2012). Кроме того, если при микозе наблюдалось увеличение активности неспецифических эстераз и ГСТ, то при смешанной инфекции данного подъема не регистрировалось (табл. 3). По всей видимости, снижение интенсивности процесса инкапсуляции и ингибирование активации

Таблица 3. Изменение физиологических показателей личинок колорадского жука на 1 и 3 сутки после заражения бактерией *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* и грибом *M. robertsii* (показаны только достоверные ($P < 0.05$) различия).

Показатели	Ткани*	Микоз	Бактериоз	Смешанная инфекция
Вес насекомых	-	на ур. контроля	снижение, 3 сут	снижение, 3 сут
Активность ЭСТ	П	повышение, 1 сут	повышение, 3сут	на ур. контроля
Активность ГСТ	Ж	на ур. контроля	снижение, 1 сут	снижение, 1 сут
Активность инкапсуляции	П	повышение 1 сут	повышение, 3сут	на ур. контроля
	Ж	на ур. контроля	снижение, 1 сут	снижение, 1 сут
	Г	на ур. контроля	снижение, 1, 3 ут	снижение, 1, 3 сут

* - П – плазма гемолимфы, Г – гемолимфа, К – кутикула, Ж – жировое тело.

ферментов детоксицирующей системы под действием бактерий может вызывать значительное снижение устойчивости насекомых к грибам, что, в свою очередь, приводит к ускоренной гибели хозяев и синергистическому эффекту в смертности насекомых. Соответственно, мы предполагаем, что сублетальное воздействие бактерий на насекомых в природе может приводить к образованию локальных очагов грибных заболеваний.

Исследуемое сочетание грибов и бактерий было испытано в серии полевых экспериментов в степной зоне Новосибирской области и в окрестностях г. Алматы. Экспериментальный препарат показал биологическую эффективность на уровне 75–95%, при этом отмечено значительное снижение дефолиации картофеля (Крюков и др., 2009).

5.3. Влияние эктопаразитоида *Habrobracon hebetor* на развитие микозов у гусениц *Galleria mellonella*

Ранее было установлено иммуносупрессивное действие яда *H. hebetor* на личинок *G. mellonella*, проявляющееся в подавлении активности фенолоксидазы в гемолимфе, а также снижении уровня инкапсуляции (Крыукова et al., 2011). Поскольку данные показатели иммунитета связаны с устойчивостью к энтомопатогенам, мы предположили, что парализация гусениц *H. hebetor* может повышать их чувствительность к аскомицетам.

Нами выявлено, что у парализованных браконом гусениц достоверно увеличивается восприимчивость к грибам *M. robertsii*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea*, *B. bassiana*. В частности, анализ LC_{50} показал, что чувствительность парализованных гусениц к *B. bassiana* увеличивается в 5000 раз: от 5.5×10^5 до 1.1×10^2 конидий/особь (Крюков и др., 2013). Для успешного прохождения и завершения микоза были достаточны «ультранизкие» дозы конидий ($1-5 \times 10^2$ конидий/особь). Эффективное заражение нативных гусениц *G. mellonella* подобными дозами не возможно. Установлено, что на кутикуле парализованных гусениц скорость прорастания конидий увеличивается в 4 раза ($p < 0.01$). Показано, что присутствие или отсутствие личинок *H. hebetor* (от 1 до 6), питающихся на парализованных гусеницах *G. mellonella*, не влияет на успешность микоза и продукцию конидий гриба на трупах.

Была оценена возможность заражения гусениц грибом посредством переноса конидий самками бракона. Установлено, что контаминация яйцеклада паразитоидов даже низкими дозами гриба (1×10^4 конидий/мл) с последующей парализацией приводит к успешному развитию микоза у

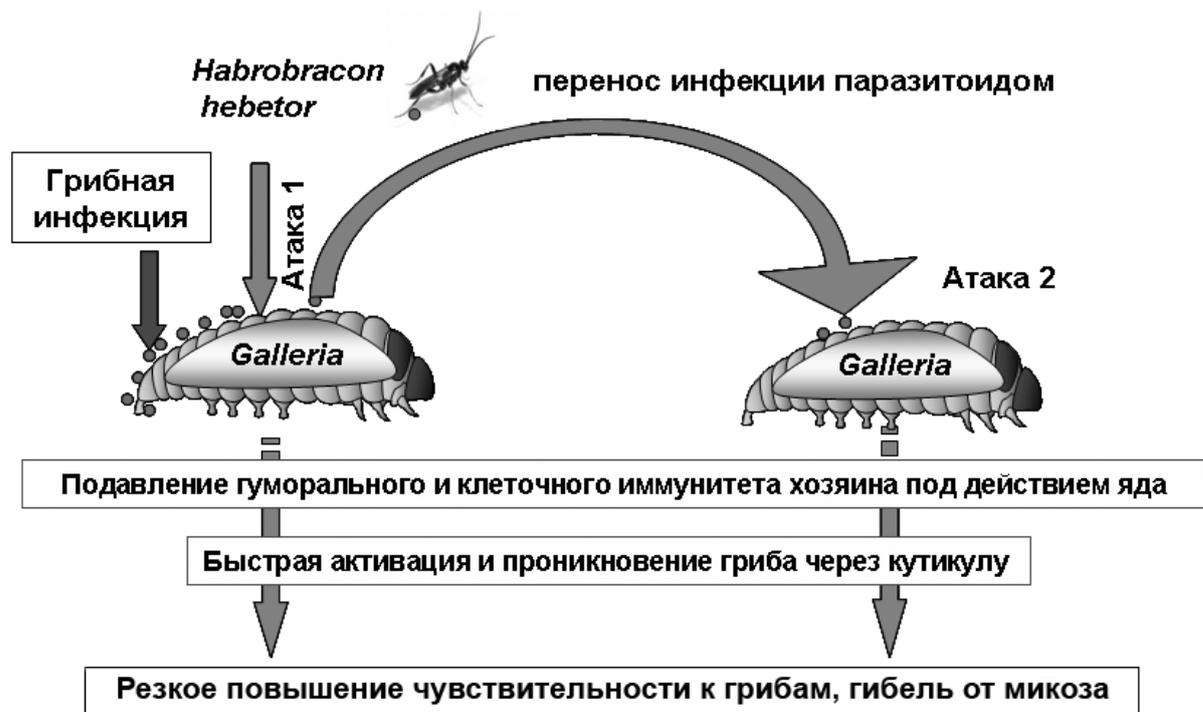


Рис. 7. Активация сублетальной грибной инфекции и горизонтальная передача грибов паразитоидом *Habrobracon hebetor* (схема).

гусениц. Кроме того, если самок бракона подсаживали к гусеницам, зараженным *B. bassiana* (доза – 10^8 конидий/мл), а после парализации гусениц самок пересаживали к нативным личинкам, у последних наблюдалась 80% смертность от микоза. Обобщенная схема активации и передачи грибной инфекции паразитоидом представлена на рис. 7.

Мы предполагаем, что подобные явления могут быть широко распространены в природе. Так, если хозяин во время парализации паразитоидом контактирует с субстратом, несущим конидии грибов, либо сублетальная грибная инфекция уже развивалась в/на кутикуле насекомого, то вероятность колонизации его тела грибом значительно увеличится. Кроме того, известно, что число парализованных паразитоидами хозяев превышает число тех, на которых в последующем будут отложены яйца (Тобиас, 2004), что увеличивает количество ресурса для развития энтомопатогенов.

Что касается передачи патогенов паразитоидами, данный вектор распространения давно выявлен для вирусов, но подобные работы по грибам не известны (Baverstock et al., 2010). На основе проведенного исследования мы полагаем, что паразитоиды могут вносить вклад в горизонтальную передачу энтомопатогенных грибов. В природе контаминация паразитоидов грибами может происходить за счет

абиотических факторов (движение воды и воздуха), а также при контакте с зараженными насекомыми или контаминированным субстратом. Резкое подавление иммунных реакций хозяина ядом паразитоида позволяет свести к минимуму количество инокулюма, переносимого паразитоидом и достаточного для того, чтобы привести к успешному развитию грибного заболевания. Кроме того, паразитоиды могут перемещать грибковый инокулюм в труднодоступные участки, например убежища, создаваемые насекомыми, а также осуществлять эффективный перенос патогенов при низкой плотности хозяев.

6. СИНТЕТИЧЕСКИЕ И ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ИНСЕКТИЦИДЫ – СИНЕРГИСТЫ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Физиологическое ослабление насекомых низкими дозами химических инсектицидов для повышения чувствительности к грибам – давно используемый подход. Однако совместное влияние грибов и инсектицидов на защитные системы насекомых изучалось лишь спорадически. Кроме того, значительный интерес представляет влияние растительных метаболитов и их химических модификантов на восприимчивость насекомых к грибам (Sahib et al., 2008; Vomfim et al., 2009 и др.).

6.1. Совместное действие фосфорорганического инсектицида Актеллик и *Metarhizium robertsii* на колорадского жука

Установлен синергизм в смертности колорадского жука при синхронной обработке личинок сублетальной дозой инсектицида Актеллик (д.в. – пермифос-метил) и относительно низкой дозой гриба *M. robertsii* (10^6 конидий/мл) (Dubovskiy et al., 2010). При микозе было установлено повышение активности неспецифических эстераз и ГСТ в жировом теле на 2 и/или 5 сутки после заражения по сравнению с контролем, тогда как, при добавлении инсектицида наблюдалось либо отсутствие увеличения активности детоксицирующих ферментов, либо ее задержка. При комбинированной обработке (*M. robertsii* + Актеллик) наблюдалось резкое 2–3 кратное снижение инкапсуляции по сравнению с контролем, микозом и обработкой только инсектицидом. Полученные результаты согласуются с данными В.В. Сереброва с соавт. (2001, 2003) о блокировании детоксицирующих ферментов фосфорорганическими инсектицидами. Таким образом, ингибирование инсектицидом систем,

ответственных за устойчивость насекомых к грибным инфекциям, может являться одной из причин синергизма патогена и инсектицида.

6.2. Модификанты усниновой кислоты – синергисты энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*

Показано, что чувствительность насекомых к грибам *B. bassiana* может повышаться под действием метаболита лишайников *Cladonia* и *Usnea* – усниновой кислоты (Крюков и др., 2008). Для поиска выраженного и стабильного синергистического эффекта был проведен скрининг 35 химических модификантов (R)- и (S)-усниновой кислоты на личинках колорадского жука (Крюков и др., 2012а). Наибольшее и стабильное повышение смертности вызвали полифторсодержащие производные (МУК-35), получаемые в реакции (S)-усниновой кислоты с гексафторпропеном (Половинка и др., 2012). Показано, что данные соединения обладают только кишечным действием на личинок. Установлено, что данные соединения не обладают репеллентными, но обладают антифидантными свойствами. При сублетальной и полулетальной обработке личинок разных возрастов (II, III, IV) соединением МУК-35 у насекомых наблюдалось нарушение питания, замедление роста, задержка окукливания и повышение чувствительности к *B. bassiana*. Данная комбинация агентов испытана в условиях континентального климата (окр. г. Алматы) и ее эффективность составила 98%. Кроме того, после обработки отмечен низкий уровень дефолиации растений, составивший 15-20% против 80-90% в контроле.

Таким образом, сходно с рассмотренными выше факторами, сублетальное воздействие инсектицидов приводит к повышению уровня смертности от грибов. Синергизм наблюдается при заражении относительно низкими дозами грибных патогенов, при которых отмечается длительное течение микозов (Крюков и др., 2012а). Данные сочетания приводят к снижению уровня дефолиации растений и могут быть перспективными для создания комбинированных биопрепаратов.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Переход мико- и фитопаразитических аскомицетов в новые адаптивные зоны (паразитирование на членистоногих) привел к появлению биологически прогрессивных групп энтомопатогенных грибов, которые характеризуются разнообразием жизненных стратегий и разным уровнем специализации к насекомым-хозяевам. Для грибов, образующих половую стадию (телеоморфные формы), характерны облигатный

паразитизм и стенобионтность, связанная с ограниченным кругом хозяев и приуроченностью к определенным биоценозам. В условиях Западной Сибири – это смешанные или мелколиственные слабо-продуваемые леса с развитым кустарниковым и травянистым ярусом, и обилием валежной древесины, что обеспечивает подходящий гигротермический режим для длительного роста плодовых тел этих грибов. Анаморфные представители *Beauveria*, *Isaria* демонстрируют все признаки деспециализации, обитая практически во всех типах биоценозов Западной Сибири и Казахстана и поражая самые разные группы насекомых. Эти грибы встречаются относительно стабильно из года в год, вызывая смертность хозяев преимущественно на энзоотическом уровне. В отличие от анаморфных, телеоморфные грибы в большей степени зависят от плотности насекомых и в условиях Сибири и вызывают эпизоотии их популяциях. Основными хозяевами доминирующих телеоморфных грибов (*Cordyceps militaris*, *Cordyceps bifusispora*) в период исследований были представители летне-осенней экологической группы чешуекрылых – филлофагов лиственных деревьев.

При анализе вирулентных свойств анаморфных грибов нами не выявлено специализации по отношению к определенным группам насекомых, что согласуется с данными других авторов (Bidochka et al., 2002; Rehner, Buckley, 2005; Meyling et al., 2009). Однако нами показано, что данная специализация может наблюдаться в некротрофной фазе развития грибов, что обусловлено возможностью образования дочернего спороношения только на определенных таксономических группах насекомых. Последнее явление более характерно для токсигенных культур, вызывающих резкое подавление клеточного иммунитета насекомых и более выраженный ответ со стороны гуморальных защитных реакций и детоксицирующей системы. Резкое физиологическое ослабление насекомых может приводить к их преждевременной гибели, то есть развитию патогенеза по типу опережающего токсикоза. При этом гриб не успевает колонизировать гемоцель хозяина и сформировать дочернее поколение конидий. Однако нами установлено, что гибель таких грибов наблюдается в большей степени в некротрофной фазе жизненного цикла – после колонизации гемоцели и формирования склероциев. Данное явление сопряжено с лучшей приспособленностью грибов к сапротрофному развитию, то есть более активному росту и высокой продуктивностью на растительных субстратах. По-видимому, токсигенные штаммы в большей степени ассоциированы с ризосферой

растений, что соотносится с рядом недавно проведенных исследований (Pava-Ripol, 2013; Hu et al., 2014). Дальнейшее изучение данных стратегий может быть направлено на изучение экспрессии генов биотрофных и токсигенных грибов, связанных с гифальным ростом и конидиеобразованием на разных хозяевах и в тканях растений. Также значительный интерес будет представлять исследование эпигенетических процессов (метилование ДНК, ацетилирование гистонов) при длительном культивировании штаммов на ИПС и пассажах через насекомых.

Дифференциация видов и популяций анаморфных грибов в значительной степени связана с приспособленностью к гигротермическим условиям местообитаний хозяев. В частности, в условиях Сибири и Казахстана, показано повышение уровня термотолерантности популяций *Beauveria bassiana* в направлении север-юг. Достаточно отчетливо выделяются генетические группы изолятов, связанные с определенными природно-климатическими зонами и отличающиеся термотолерантностью (степные культуры) или психротолерантностью (лесотундровые культуры). Также у криптоических видов р. *Metarhizium* выявлены различия по гигротермическим предпочтениям и ряду других адаптаций, связанных с обитанием в лесных, либо открытых ценозах. При моделировании условий резко-континентального климата, а также непосредственно в агроландшафтах Западной Сибири и Казахстана, наиболее успешно микоз реализуется именно у термотолерантных культур (*M. robertsii*, степные изоляты *B. bassiana*). В связи с этим, их использование наиболее перспективно для регуляции численности насекомых в условиях континентального климата.

Данные исследования лежат в рамках гипотезы «селекции патогенов средой обитания» (Bidochka et al., 2001, 2002, 2005; Wyrebek et al., 2011; Wyrebek, Bidochka, 2013), согласно которой, в дивергенции широко-специализированных грибов (*Beauveria*, *Metarhizium*) приспособление к определенным таксонам хозяев не имеет решающего значения, а более важна связь грибов с теми или иными растительными ассоциациями и адаптации к определенным гигротермическим условиям. Однако отметим, что данная гипотеза не учитывает состояния защитных систем насекомых-хозяев. Проведенное нами исследование показывает что, "выбор" насекомого грибом может не зависеть от таксономической принадлежности хозяина, но возможность развития на определенном

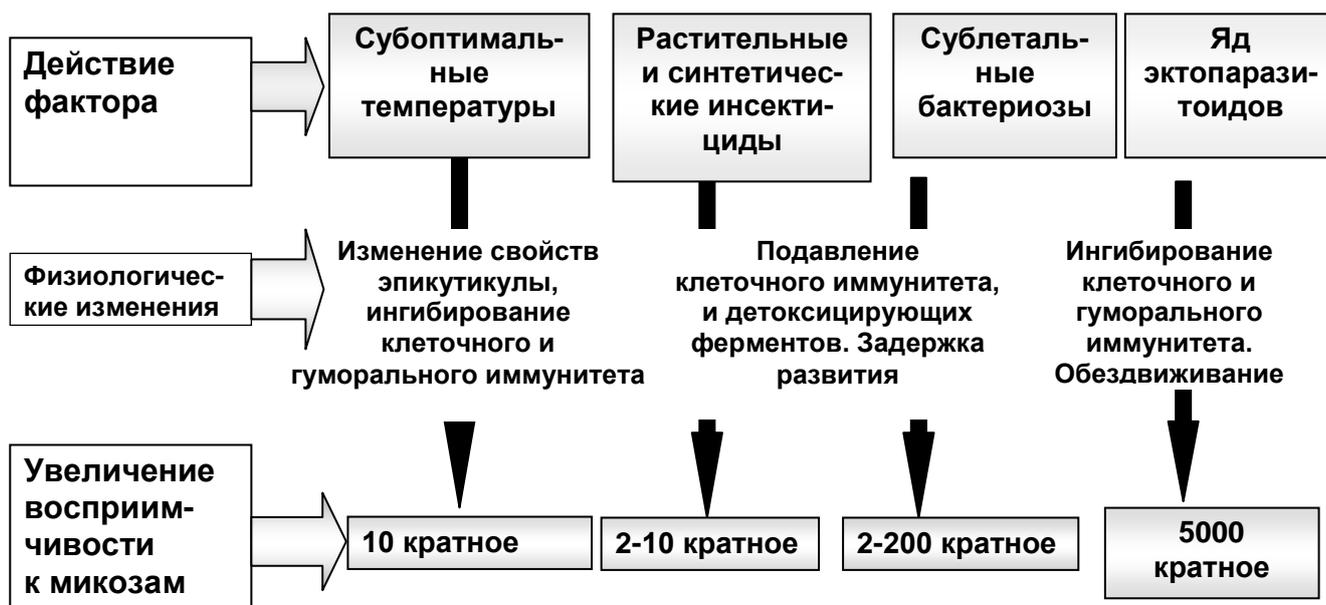


Рис. 8. Изменение в защитных системах и уровне восприимчивости насекомых к анаморфным грибам под действием различных средовых факторов (схема).

хозяйине связана с функционированием его защитных систем. Так, вероятность успешного микоза у насекомых с нарушенным, под действием различных факторов, защитным ответом возрастает в десятки, сотни и тысячи раз.

Идея о том, что анаморфные грибы поражают ослабленных насекомых, признавалась *apriori* еще в 60-70-х гг. XX века (Ильинский, Тропин, 1965; Вейзер, 1972; Евлахова, 1974), а также поддерживается рядом исследователей в настоящее время (Boomsma et al., 2014). Однако механизмы увеличения чувствительности к грибам под воздействием различных средовых факторов оставались в большинстве случаев не раскрытыми. Нами показано, что под влиянием таких факторов, как пониженная температура, сублетальные бактериозы, парализация паразитоидами, воздействие синтетических (пермифос-метил), полусинтетических (модификанты усниновой кислоты), грибных (*Cordyceps*) инсектицидов, происходят изменения, затрагивающие жирнокислотный состав эпикутикулы, наблюдается подавление реакций клеточного и гуморального иммунитета, детоксицирующей системы, происходит задержка роста, удлинение межлиночного периода, нарушение линьки, что приводит к многократному повышению чувствительности к анаморфным грибам (рис. 8). Данные явления сопоставимы с патогенезами, вызванными неспецифическими патогенами у высших животных. Так, под действием различных стрессовых воздействий, переохлаждений, специфических инфекций и паразитарных

инвазий может происходить подавление ряда защитных систем, что ведет к заселению органов и систем неспецифическими патогенами. Показано, что у человека микозные инфекции могут являться своеобразными индикаторами состояния иммунной системы (Корнишева, Могилева, 2013). Соответственно, имеются определенные параллели, характерные для возбудителей микозов позвоночных и беспозвоночных животных.

Таким образом, подавленный неспецифический иммунитет хозяев является важным условием для успешного развития анаморфных грибов. Что же касается более специализированных телеоморфных форм, вероятно, здесь действуют другие механизмы восприимчивости/устойчивости хозяев. Комплексное исследование этих более сложных взаимоотношений в будущем должно включать оценку пороговых доз инфекции, необходимых для развития микозов, установление воздействия метаболитов грибов на гормональный статус, процессы гистолиза и гистогенеза насекомых, изучение эдафических предпочтений телеоморф, а также механизмов конкуренции между телеоморфными и анаморфными видами грибов.

В прикладном аспекте данной работы мы можем заключить, что для создания эффективных биологических препаратов на основе анаморфных грибов необходимо их комбинирование с добавками, ингибирующими реакции клеточного, гуморального иммунитета и детоксицирующей системы насекомых, задерживающих процессы линьки и метаморфоза. Данными ингибиторами могут являться энтомопатогенные бактерии, метаболиты грибов, растений, их производные, а также различные синтетические соединения. Особенно перспективно будет применение таких агентов, как яды перепончатокрылых. Развитие подхода с использованием ядов или их синтетических аналогов позволит создать новые биопрепараты, в том числе на основе нанотехнологических и генноинженерных подходов. Данные биопрепараты будут во много раз превышать эффективность современных.

ВЫВОДЫ

1. На территории Западной Сибири и Казахстана для телеоморфных грибов (р. *Cordyceps*, *Ophiocordyceps*) характерны локальное распространение, стеноитопность, а спектр их хозяев ограничен определенными таксонами насекомых. Анаморфные грибы (р. *Beauveria*, *Isaria*) характеризуются повсеместным распространением, эвриитопностью и обширным спектром насекомых-хозяев.

2. Энтомопатогенные аскомицеты р. *Cordyceps* вызывают эпизоотии в популяциях чешуекрылых и пилильщиков летне-осеннего комплекса в северо-лесостепных биоценозах Сибири. Грибы способны вызывать 100% гибель зимующего запаса куколок. В очагах эпизоотий *Cordyceps militaris* поражает более 30 видов разноусых чешуекрылых из 7 семейств, а также пилильщиков семейства Cymbicidae. Вид *Cordyceps bifusispora* имеет более узкую трофическую специализацию, поражая представителей семейства Thyatiridae (Lepidoptera).

3. Изоляты анаморфного аскомицета *Beauveria bassiana* s.l., выделенные из разных групп насекомых-хозяев, не демонстрируют трофических преференций по отношению к прямокрылым, жесткокрылым, чешуекрылым. Селекция гриба через определенного хозяина приводит к усилению вирулентности не только к целевому объекту, но и насекомым других систематических групп.

4. При токсигенном типе микоза, вызванном *Metarhizium robertsii*, происходит быстрое подавление клеточного иммунитета хозяев и выраженный ответ со стороны гуморальной и детоксицирующей систем, по сравнению с биотрофным типом микоза. При этом у токсигенных штаммов проявляется специализация, связанная с возможностью конидиеобразования только на определенных группах насекомых. Токсигенная стратегия сопряжена с более высокой приспособленностью грибов к сапротрофному развитию.

5. Метаболиты *Cordyceps militaris* обладают токсическим действием по отношению к личинкам колорадского жука и вошинной огневки, вызывая нарушение пролиферации гемоцитов, изменение уровня фенолоксидазы в кутикуле и гемолимфе, задержку роста и линьки, а также повышение чувствительности насекомых к грибам *Beauveria bassiana*.

6. На равнинных территориях Западной Сибири и Казахстана у популяций *Beauveria bassiana* с понижением широты местности увеличивается термотолерантность. При повышенных температурах

(>30°C) наибольшую вирулентность и способность завершать жизненный цикл на насекомых-хозяевах показывают степные изоляты гриба.

7. Из грибов р. *Metarhizium* наибольшая вирулентность в условиях степной зоны Западной Сибири характерна для штаммов *Metarhizium robertsii*, обладающих высокой термотолерантностью и комплексом адаптаций, связанных с обитанием в открытых ценозах.

8. Под воздействием пониженных субоптимальных температур у гусениц *Galleria mellonella* происходят изменения количественного соотношения жирных кислот в эпикутикуле, повышение уровня адгезии конидий *Metarhizium robertsii* на покровах, снижение уровня инкапсуляции в гемоцели и задержка активации фенолоксидазы в кутикуле при микозе, что приводит к резкому повышению восприимчивости насекомых к грибам.

9. При совместном действии анаморфных грибов (*Beauveria* или *Metarhizium*) и бактерий *Pseudomonas* sp. на личинок саранчовых (*Locusta migratoria*) наблюдаются аддитивный или синергистический эффекты в смертности насекомых. В погибшем хозяине может наблюдаться как элиминация одного из патогенов, так и их сосуществование.

10. Под воздействием сублетальных доз *Bacillus thuringiensis morissoni* var. *tenebrionis* у личинок колорадского жука регистрируется задержка развития, снижение уровня инкапсуляции, подавление ферментов детоксицирующей системы и резкое увеличение чувствительности к анаморфным грибам *Metarhizium robertsii*. Синергизм между данными патогенами наблюдается при инфицировании всех личиночных возрастов колорадского жука.

11. При парализации гусениц *Galleria mellonella* эктопаразитом *Habrobracon hebetor*, их восприимчивость к анаморфным аскомицетам увеличивается в тысячи раз. Присутствие или отсутствие личинок бракона, питающихся на парализованном хозяине, не влияет на исход микозов и продукцию конидий грибов. Паразитоиды могут осуществлять трансмиссию энтомопатогенных грибов.

12. Воздействие фосфор-органического инсектицида пермифос-метила и производных усниновой кислоты на личинок колорадского жука приводит к повышению чувствительности к грибам *Metarhizium robertsii*, *Beauveria bassiana*. Из производных усниновой кислоты наиболее эффективными синергистами являются фторированные модификанты.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций:

1. Леднев Г.Р., **Крюков В.Ю.**, Ходырев В.П., Левченко М.В., Дуйсембеков Б.А., Сагитов О.А., Глупов В.В. Динамика гибели азиатской саранчи при синхронном заражении энтомопатогенными грибами (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*) и бактерией *Pseudomonas* sp. // Сибирский экологический журнал. – 2007. – № 4. – С. 527-531. – 0,31 / 0,04 п.л. Переводная версия: Lednev G.R., **Kryukov V.Yu.**, Khodyrev V.P., Levchenko M. A., Duisembekov B.A., Sagitov A.O., Glupov V.V. Dynamics of mortality of the migratory locust under synchronous infection with entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) and bacteria *Pseudomonas* sp. // Contemporary Problems of Ecol. – 2008. – V. 1. №, 2. – P. 210–213. – DOI: 10.1134/S1995425508020069. (включена в Web of Science).

2. **Крюков В.Ю.**, Леднев Г.Р., Дубовский И.М., Серебров В.В., Левченко М.В., Ходырев В.П., Сагитов А.О., Глупов В.В. Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Nyphomycetes) для регуляции численности насекомых // Евразийский энтомологический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 195-204. – 0,63 / 0,08 п.л.

3. **Крюков В.Ю.**, Серебров В.В., Малярчук А.А., Копжасаров Б.К., Мухамедиев Н.С., Орынбаева А.К., Ходырев В.П. Перспективы использования энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Nyphomycetes) против колорадского жука в условиях Юго-Восточного Казахстана // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2007. – № 4. – С. 52-60. – 0,56 / 0,08 п.л.

4. **Крюков В.Ю.**, Ярославцева О.Н. *Cordyceps militaris* – целебная трава, поедающая гусеницу // Наука из первых рук. – 2007. – № 4 (16). – С. 6-9. – 0,25 / 0,13 п.л.

5. Леднев Г.Р., **Крюков В.Ю.**, Чернышёв С.Э. Первая находка *Cordyceps militaris* Fries. (Ascomycota, Clavicipitales) в Западной Сибири // Евразийский энтомологический журнал – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 253-254. – 0,13 / 0,04 п.л.

6. **Крюков В.Ю.**, Мартемьянов В.В., Половинка М.П., Лузина О.А., Дубовский И.М., Серебров В.В., Ходырев В.П., Малярчук А.А., Гербер О.Н., Ярославцева О.Н., Боярищева Е.А., Левченко М.В., Глупов В.В., Салахутдинов Н.Ф., Толстиков Г.А. Усниновая кислота – перспективный синергист для биопрепаратов на основе энтомопатогенных микроорганизмов // Доклады академии наук. – 2008. – Т. 423, № 2. – С. 279-282. – 0,25 / 0,02 п.л.

7. Ходырев В.П., Чадинова А.М., Исин М.М., Мухамедиев Н.С., **Крюков В.Ю.** Вспышки массового размножения и возбудители болезней осиновой хохлатки *Pheosia tremula* (Clerck) на юге Западной Сибири // Евразийский энтомологический журнал. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 373-376. – 0,25 / 0,05 п.л.

8. **Крюков В.Ю.**, Ходырев В.П., Ярославцева О.Н., Каменова А.С., Дуйсембеков Б.А., Глупов В.В. Синергетическое действие энтомопатогенных гифомицетов и бактерий *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* при инфицировании личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 571-576. – 0,38 / 0,06 п.л. Переводная версия: **Kryukov V.Yu.**, Khodyrev V.P., Yaroslavtseva O.N., Kamenova 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* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2009. – V. 45, №. 5. – P. 511–516. – DOI: 10.1134/S000368380905010X. (включена в Web of Science).

9. **Крюков В.Ю.**, Ярославцева О.Н., Левченко М.В., Леднев Г.Р., Глупов В.В. Фенотипическая изменчивость природных изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* // Микология и фитопатология. – 2009. – Т. 43, № 6. – С. 514-521. – 0,5 / 0,1 п.л. Переводная версия: **Kryukov V.Yu.**, Yaroslavtseva O.N., Levchenko M.V., Lednyov G.R., Glupov V.V. Phenotypic variability of environmental isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* // Microbiology (Mikrobiologiya). – 2010. – V. 79, №. 2. – P. 265–269. – 0,31 / 0,06 п.л. – DOI: 10.1134/S0026261710020207.(включена в Web of Science).

10. Половинко Г.П., Ярославцева О.Н., Тешебаева З.А., **Крюков В.Ю.** Доминирующие виды энтомофильных анаморфных аскомицетов Западной Сибири, Приморья и Киргизии // Сибирский экологический журнал. – 2010. – № 5. – С. 709-716. – 0,50 / 0,13 п.л. Переводная версия: Polovinko G.P., Yaroslavtseva O.N., Teshebaeva Z.A., **Kryukov V.Yu.** Dominant species of entomophilous ascomycetes anamorphs in West Siberia, Primorsky Krai, and Kyrgyzstan // Contemporary Problems of Ecology. – 2010. – V. 3, №. 5. – P. 515–521. – DOI: 10.1134/S1995425510050024. (включена в Web of Science).

11. **Крюков В.Ю.**, Леднев Г.Р., Левченко М.В., Ярославцева О.Н., Макаров Е.М., Баймагамбетов Е.Ж., Дуйсембеков Б.А., Глупов В.В. Влияние наполнителей на биологическую эффективность энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* против саранчовых в условиях Казахстана // Агрехимия. – 2010. – № 12. – С. 26-30. – 0,31/ 0,04 п.л.

12. Dubovskiy I.M., **Kryukov V.Yu.**, Benkovskaya G.V., Yaroslavtseva O.N., Surina E.V., Glupov V.V. Activity of detoxificative enzymes system and encapsulation rate in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* larvae under organophosphorus insecticide treatment and entomopathogenic fungus *Metharizium anisopliae* infection // Евразийский энтомологический журнал. – 2010. – Т.9, № 4. – С. 577-582. – 0,38 / 0,06 п.л.

13. **Крюков В.Ю.**, Дубовский И.М., Ярославцева О.Н., Левченко М.В., Слямова Н.Д., Белгибаева А.Б., Ходырев В.П., Леднев Г.Р., Глупов В.В. Сравнительный анализ двух штаммов энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* с разными жизненными стратегиями // Микология и фитопатология. – 2011. – Т. 45, Вып. 2. – С. 164-176. – 0,81 / 0,09 п.л.

14. Дубовский И.М., Слямова Н.Д., **Крюков В.Ю.**, Ярославцева О.Н., Левченко М.В., Белгибаева А.Б., Адилханкызы А., Глупов В.В. Активность неспецифических эстераз и глутатион-S-трансфераз у личинок азиатской саранчи *Locusta migratoria* при развитии грибной инфекции *Metarhizium anisopliae* // Зоологический журнал. – 2011. – Т. 90, №11. – С. 1360-1364. – 0,38 / 0,04 п.л. (включена в Web of Science).

15. **Крюков В.Ю.**, Ярославцева О.Н., Леднев Г.Р., Борисов Б.А. Локальные эпизоотии, вызванные телеоморфными кордицепитоидными грибами (Ascomycota: Hypocreales) в популяциях лесных чешуекрылых и пилильщиков летне-осеннего комплекса в Сибири // Микология и фитопатология. – 2010. – Т. 44, №4. – С. 315-328. – 0,81 / 0,20 п.л. Переводная версия: **Kryukov V.Yu.**, Yaroslavtseva O.N., Lednev G.R., Borisov B. A. Local epizootics caused by teleomorphic cordycipitoid fungi (Ascomycota: Hypocreales) in populations of forest lepidopterans and sawflies of the summer–autumn complex in Siberia // Microbiology (Mikrobiologiya). – 2011. – V. 80, № 2. – P. 286–296. DOI: 10.1134/S0026261711020093. (включена в Web of Science).

16. Gorbunova I.A., **Kryukov V.Yu.**, Zibzeev E.G. First records of the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps gracilis* (Ascomycota, Hypocreales) from Siberia // Евразийский энтомологический журнал. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 17–18, 22. – 0,18 / 0,06 п.л.

17. **Крюков В.Ю.**, Лузина О.А., Ярославцева О.Н., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Глупов В.В. Скрининг модификантов усниновой кислоты – потенциальных синергистов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* для регуляции численности колорадского жука // Агрехимия. – 2012а. – № 2. – С. 59-66. – 0,50 / 0,08 п.л.

18. **Крюков В.Ю.**, Ярославцева О.Н., Кухаренко А.Е., Глупов В.В. Культивирование стром энтомопатогенного гриба *Cordyceps militaris* (Ascomycota: Hypocreales) на неспецифических хозяевах // Микология и фитопатология. – 2012б. – Т. 46, Вып. 4. – С. 269-272. – 0,25 / 0,06 п.л.

19. Леднев Г.Р., Левченко М.В., **Крюков В.Ю.**, Митьковец П.В., Ярославцева О.Н., Успанов А.М., Павлюшин В.А. Состояние и перспективы использования энтомопатогенных грибов для контроля численности саранчовых // Защита и карантин растений. – 2012. – № 6. – С. 18-21. – 0,25 / 0,04 п.л.

20. **Крюков В.Ю.**, Ярославцева О.Н., Елисафенко Е.А., Митьковец П.В., Леднев Г.Р., Дуйсембеков Б.А., Закиян С.М., Глупов В.В. Изменение температурных предпочтений изолятов *Beauveria bassiana* в широтном градиенте Сибири и Казахстана // Микробиология. – 2012. – Т. 81, №. 4. – С. 493-499. – 0,44 / 0,05 п.л. Переводная версия: **Kryukov V.Yu.**, Yaroslavtseva O.N., Glupov V.V., Elisaphenko E.A., Zakian S.M., Mitkovets P.V., Lednev G.R., Duisembekov B.A Change in the temperature preferences of *Beauveria bassiana sensu lato* isolates in the latitude gradient of Siberia and Kazakhstan // Microbiology (Mikrobiologiya). – 2012. – V. 81, Is 4. – P. 453-459. DOI: 10.1134/S002626171204011X. (включена в Web of Science).

21. **Крюков В.Ю.**, Кухаренко А.Е., Дубовский И.М., Глупов В.В. Продукция кордицепина и аденозина в мицелии и культуральной жидкости изолятов *Cordyceps militaris* // Микология и фитопатология. – 2012. – Т. 46, № 6. – С. 390-396. – 0,44 / 0,11 п.л.

22. **Крюков В. Ю.**, Крюкова Н.А., Глупов В.В. Изменение восприимчивости гусениц *Galleria mellonella* к анаморфным энтомопатогенным аскомицетам при парализации эктопаразитомидом *Habrobracon hebetor* // Экология. – 2013. – № 1. – С. 73-76. – 0,25 / 0,08 п.л. Переводная версия: **Kryukov V.Y.**, Kryukova N.A., Glupov V.V. Susceptibility of *Galleria mellonella* Larvae to Anamorphic Entomopathogenic Ascomycetes under Envenomation and Parasitization by *Habrobracon hebetor* // Russian Journal of Ecology. – 2013. – V. 44, №. 1. – P. 89–92. DOI: 10.1134/S1067413613010074. (включена в Web of Science).

23. Dubovskiy I.M., Whitten M.M.A., Yaroslavtseva O.N., Greig C., **Kryukov V.Y.**, Grizanova E.V., Mukherjee K., Vilcinskas A., Glupov V.V., Butt T.M. Can Insects Develop Resistance to Insect Pathogenic Fungi? // PloS One. – 2013. – V. 8, № 4. – journal.pone.0060248. – 1,3 / 0,13 п.л. DOI: 0.1371/journal.pone.0060248. (включена в Web of Science).

24. Dubovskiy I.M., Whitten M.M.A., **Kryukov V.Y.**, Yaroslavtseva O.N., Grizanova E.V., Greig C., Mukherjee K., Vilcinskas A., Mitkovets P., Glupov V.V., Butt T.M. More than a colour change: Insect melanism, disease resistance and fecundity // Proceedings of Royal Society. Biology. – 2013. – V. 280, № 1763. – UNSP 20130584. – 1,54 / 0,14 п.л. DOI: 10.1098/rspb.2013.0584. (включена в Web of Science).

25. Дубовский И. М., Ярославцева О.Н., **Крюков В.Ю.**, Беньковская Г.В. Глупов В.В. Увеличение активности иммунной системы вошинной огневки *Galleria mellonella* и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* под влиянием фосфорорганического инсектицида // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2013. – Т. 49, № 6. – С. 428-432. – 0,31 / 0,06 п.л. Переводная версия: Dubovskiy I., Yaroslavtseva O., **Kryukov V.**, Benkovskaya G., Glupov V. An increase in the immune system activity of the wax moth *Galleria mellonella* and of the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* under effect of organophosphorus insecticide // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2013. – V. 49, №6. – P. 592-596. DOI: 10.1134/S0022093013060066. (включена в Web of Science).

26. Ходырев В.П., Дубовский И.М., **Крюков В.Ю.**, Глупов В.В. Восприимчивость личинок *Anopheles messeae* Fall и *Culex pipiens pipiens* L к энтомопатогенным грибам *Metarhizium* // Сибирский экологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 435-438. – 0,25 / 0,06 п.л. Переводная версия: Khodyrev V.P., Dubovskiy I.M., **Kryukov V.Y.**, Glupov V.V. Susceptibility of *Anopheles messeae* Fall. and *Culex pipiens pipiens* L. larvae to entomopathogenic fungi *Metarhizium* // Contemporary Problems of Ecology. – 2014. – №3. – P. 435-438. DOI: 10.1134/S1995425514030068. (включена в Web of Science).

27. **Крюков В.Ю.**, Ярославцева О.Н., Дубовский И. М., Тюрин М.В., Крюкова Н.А., Глупов В.В. Инсектицидное и иммуносупрессивное действие

аскомицета *Cordyceps militaris* на личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2014. – № 3. – С. 296-303. – 0,50 / 0,08 п.л. Переводная версия: **Kryukov V.Y.**, Yaroslavtseva O. N., Dubovskiy I. M., Tyurin M. V., Kryukova N. A., Glupov V. V. 2014. Insecticidal and immunosuppressive effect of ascomycete *Cordyceps militaris* on the larvae of the colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* // *Biology Bulletin*. – 2014. – V. 41, №3. – P. 276–283. DOI: 10.1134/S1062359014020046. (включена в Web of Science).

Патенты:

28. Патент 2328493. Российская Федерация, МПК: C07D307/91, A01P7/04. Применение усниновой кислоты в качестве синергиста инсектицидов на основе энтомопатогенных микроорганизмов / Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф. Лузина О.А., Глупов В.В., Серебров В.В., Дубовский И.М., Мартемьянов В.В., Крюков В. Ю., Патентообладатели – НИОХ СО РАН, ИСиЭЖ СО РАН. – опубл. 10.07.2008. Бюл. № 19. 11 с.

29. Патент № 2448464. Российская Федерация, МПК: A01P7/04, C07D307/91, C07D493/04. Синергист для повышения эффективности биопрепаратов против колорадского жука / Половинка М.П., Лузина О.А. Салахутдинов Н.Ф. Крюков В.Ю., Ярославцева О.Н., Ходырев В.П., Глупов В.В. Патентообладатели – НИОХ СО РАН, ИСиЭЖ СО РАН. – опубл. 27.04.2012. Бюл. № 12. 11 с.

30. Патент № 26599. Республика Казахстан. Штамм гриба *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ЮК₄ – 09 для получения биопрепарата против саранчовых / Сагитов А.О., Дуйсембеков Б.А., Крюков В.Ю., Баймагамбетов Е.Ж., Слямова, Н.Д. Смагулова Ш.Б., Успанов А.М. Патентообладатель – КазНииЗиКР. – зарегистрирован 25.12.2012. 3 с.

Публикации в других научных изданиях:

31. Крюков В.Ю. Совковидки (Lepidoptera, Thyatiridae) Южного Зауралья // Биологическая защита леса и лесопатологический мониторинг в России. Информационный бюллетень № 1. – 2002. – С. 166-171. – 0,38 п. л.

32. Крюков В.Ю. Трофические связи разноусых чешуекрылых (Lepidoptera, Macroheterocera) – филлофагов основных древесных растений в Южном Зауралье // Евразийский энтомологический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 77-87. – 0,69 п.л.

33. Левченко М.В., Крюков В.Ю., Леднев Г.Р. Влияние фазовой изменчивости хозяина на чувствительность перелетной саранчи к энтомопатогенным гифомицетам // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. – 2007. – № 38. – С. 156-158. – 0,19 / 0,06 п. л.

34. Крюков В.Ю., Дуйсембеков Б.А., Ярославцева О.Н., Смагулова Ш.Б., Ходырев В.П. Течение микозов колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* (Say)), при инфицировании различными штаммами *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill и *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin в Юго-Восточном Казахстане // Вестник аграрной науки Узбекистана. – 2007. – № 1-2. – С. 23-28. – 0,38 / 0,08 п. л.

35. Gninenko Yu., **Kryukov V.Yu.** Siberian moth in forest of the European part of Russia // Plant science (Sofia). – 2007. – V. 44, № 3. – P. 256-258. – 0,19 / 0,09 п.л.

36. Дубовский И.М., Слямова Н.Д., Бельгибаева А.Б., Адилханкызы А., **Крюков В.Ю.**, Левченко М.В., Дуйсембеков Б.А. Активность неспецифических эстераз *Locusta migratoria* при грибных инфекциях // Вестник сельскохозяйственных наук Казахстана. – 2008. – № 8. – С. 39-43. – 0,31 / 0,04 п.л.

37. **Крюков В.Ю.**, Ярославцева О.Н., Леднев Г.Р., Борисов Б.А. Энтомопатогенные свойства аскомицета *Cordyceps militaris* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – №1. – С. 111-112. – 0,13 / 0,03 п. л.

38. Ярославцева О.Н., Дубовский И.М., **Крюков В. Ю.**, Ходырев В.П., Глупов В.В. Активность реакций клеточного иммунитета и компонентов детоксицирующей системы у личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* при развитии смешанной инфекции вызванной грибом *Metarhizium anisopliae* и бактерией *Bacillus thuringiensis* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – №1. – С. 142-143. – 0,13 / 0,03 п.л.

39. Леднев Г.Р., **Крюков В.Ю.**, Левченко М.В., Успанов А.М., Сагитов А.О., Глупов В.В., Павлюшин В.А. Подходы к созданию новых микоинсектицидов и разработке стратегии их применения в защите растений для аридных зон // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. – 2011. – № 43. – С. 132-136. – 0,31 / 0,04 п.л.

40. Ярославцева О.Н., Дубовский И.М., **Крюков В.Ю.**, Глупов В.В. Активность ферментов детоксицирующей системы и реакций клеточного иммунитета личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) при смешанной инфекции, вызванной грибами *Metarhizium anisopliae* и бактериями *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *tenebrionis* // Труды Русского энтомологического общества. – 2012. – Т. 83, № 1. – С. 5-14. – 0,63 / 0,16 п.л.

41. Глупов В.В., **Крюков В.Ю.**, Мартемьянов В.В., Юрлова Н.И. Многоликий мир паразитов // Наука в России. – 2013. – № 4. – С. 12-20. – 0,56 / 0,14 п.л.

Подписано в печать 20.01.2015. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Гарнитура “Times New Roman”.
Печ. л. 2,0. Тираж 120 экз. Заказ № 323.

Издательство «Любава»
630090, Новосибирск, ул. Академическая, 27.
Тел. (283)3330878, 89612243018