

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

Выпускная квалификационная работа магистра

На тему:

«Морфологические и физиологические
особенности редких и хозяйственно-значимых
энтомопаразитических грибов в культуре»

Выполнила: студентка 2 курса магистратуры
Староверова Вероника Игоревна

Научные руководители:
н.с. Борисов Борис Александрович,
в.н.с., д.б.н. Александрова Алина Витальевна

Актуальность

- Энтомопаразитические грибы играют очень важную роль в экосистемах, сдерживая численность беспозвоночных (Evans, 1982).
- Их активно изучают и применяют во многих странах как агентов биоконтроля вредных растительноядных насекомых (Faria, Wright, 2007); внедряют в местообитания членистоногих – переносчиков опасных болезней человека и теплокровных животных
- Кордицепитоидные грибы (Ascomycota, Hypocreales: представители трёх близких семейств *Cordycipitaceae*, *Ophiocordycipitaceae*, *Clavicipitaceae*) рассматривают как новые источники биологически активных метаболитов для производства лекарственных препаратов и БАВов (Isaka et al., 2005).
- Для внедрения в биотехнологию необходимо знать морфологические и физиологические особенности этих грибов в культуре.

Цель: изучить физиологические особенности и морфологию редких и хозяйственно-значимых энтомопаразитических грибов.

Задачи:

1. Описать морфологию отобранных для исследования изолятов на твёрдых средах;
2. Выяснить отношение к температуре исследуемых изолятов грибов;
3. Установить, какие источники азота и углерода усваиваются исследуемыми изолятами и их оптимальное соотношение;
4. Определить отношение исследуемых грибов к кислотности среды;
5. Выяснить отношение изолятов к показателю активности (доступности) воды.

Материалы и методы

1. Коллекция из 6 изолятов:

Con. lut. A2.3., *Con. lut. A8.1.*, *Con. lut. 5/8*, *Con. lut. TCP*,
Purp. takam. Eli., *Beauv. Lp-S(Ag)16*;

2. Изучение морфологии на твёрдой среде Сусло-Агар;

3. Исследование физиологических особенностей грибов в соответствии с поставленными задачами.



Поражённое
насекомое/
Чистая
культура

Морфологическая
характеристика
вида

+ Молекулярная
характеризация

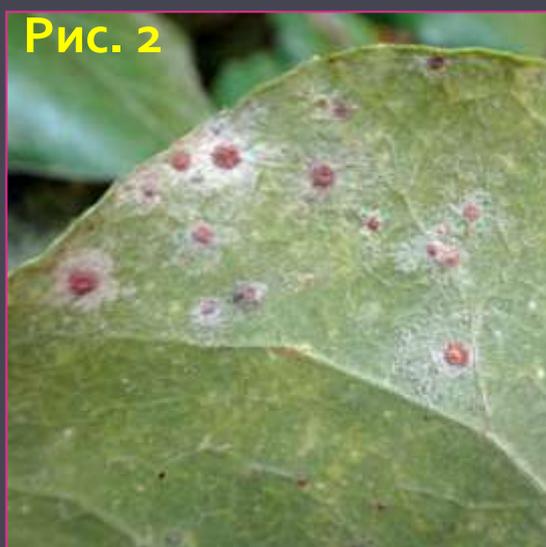
Физиологические
особенности
штамма

Изоляты *Conoideocrella luteorostrata*

1 - Конец ноября 2013 г.: окрестности г. Сочи, Сочинский нац. парк, Агурское ущелье, на личинках белокрылки на листьях шалфея клейкого (рис. 1);

2 - Конец сентября 2016 г.: окрестности Сочи, Кавказский биосферный заповедник, «Тисо - самшитовая роща», на коричневой щитовке на листьях плюща колхидского (рис. 2).

3 - Сентябрь 2015 г.: Московская обл., Одинцовский р-н, лес в окрестностях жел.-дор. ст. «Голицыно», на личинках белокрылки на листьях копытня европейского (рис. 3);



**Материалы и фотографии поражённых насекомых предоставлены
Б.А. Борисовым, ООО «АгроБиоТехнология», Москва**



Фото: Борисов Б.А.



Рис. 5



Рис. 7

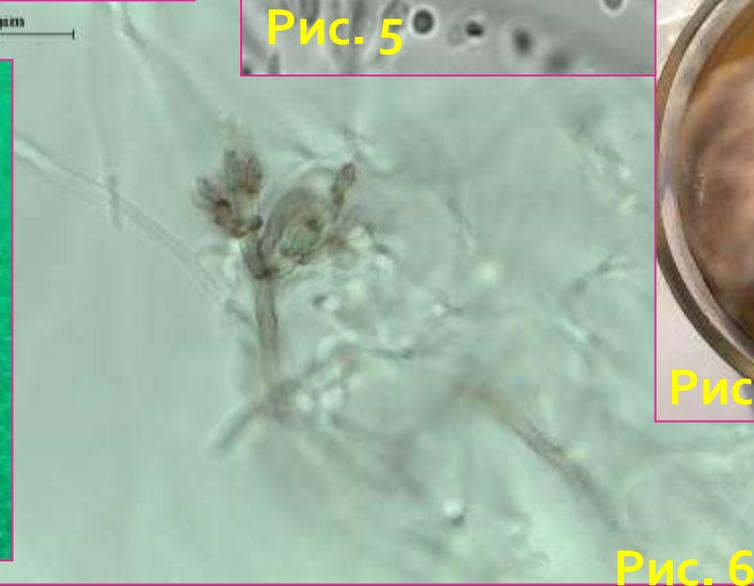


Рис. 6



Рис. 4

Фото: Борисов Б.А.

Рис. 4-7 Макро- и микроморфология *Purpureocillium takamizusanense*



Рис. 8



Рис. 9

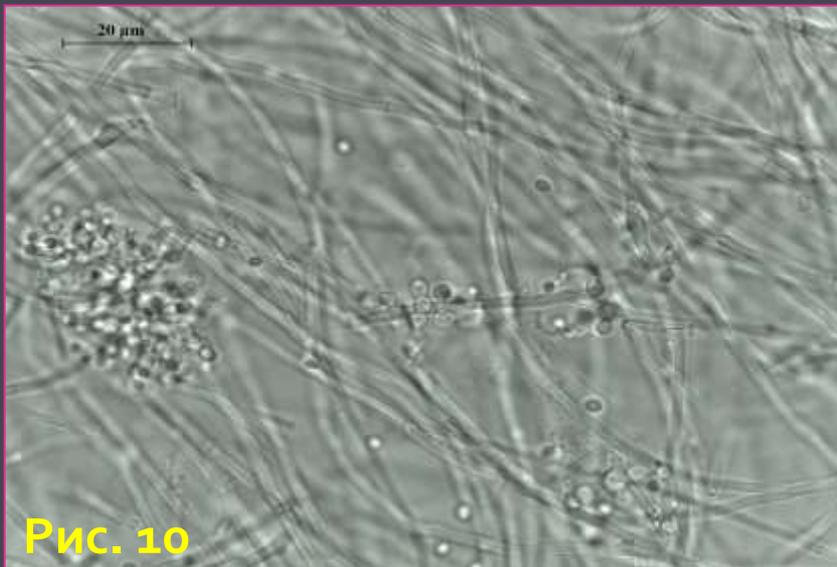


Рис. 10



Рис. 11

Рис. 8-11 Макро- и микроморфология *Beauveria bassiana* s.l.

Результаты

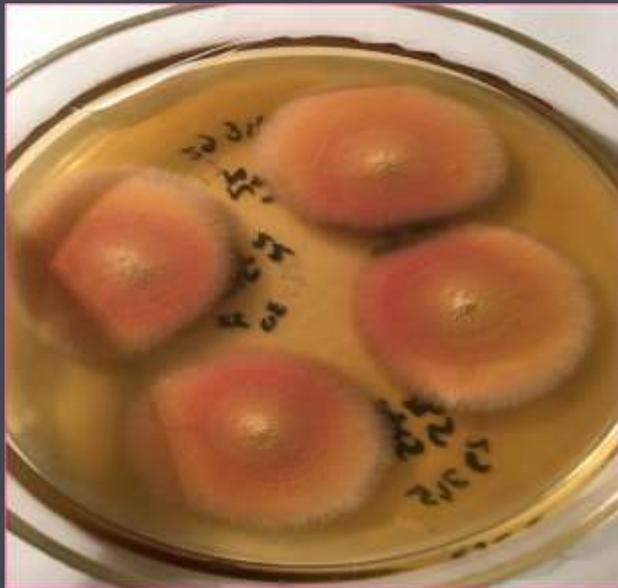


Рис. 13 Внешний вид колоний *Conoideocrella luteorostrata*



Рис. 15 Внешний вид колоний *Purpureocillium takamizusanense*



Рис. 14 Морфология мицелия *Conoideocrella luteorostrata*



Рис. 16 Внешний вид колоний *Beauveria bassiana* s.l.

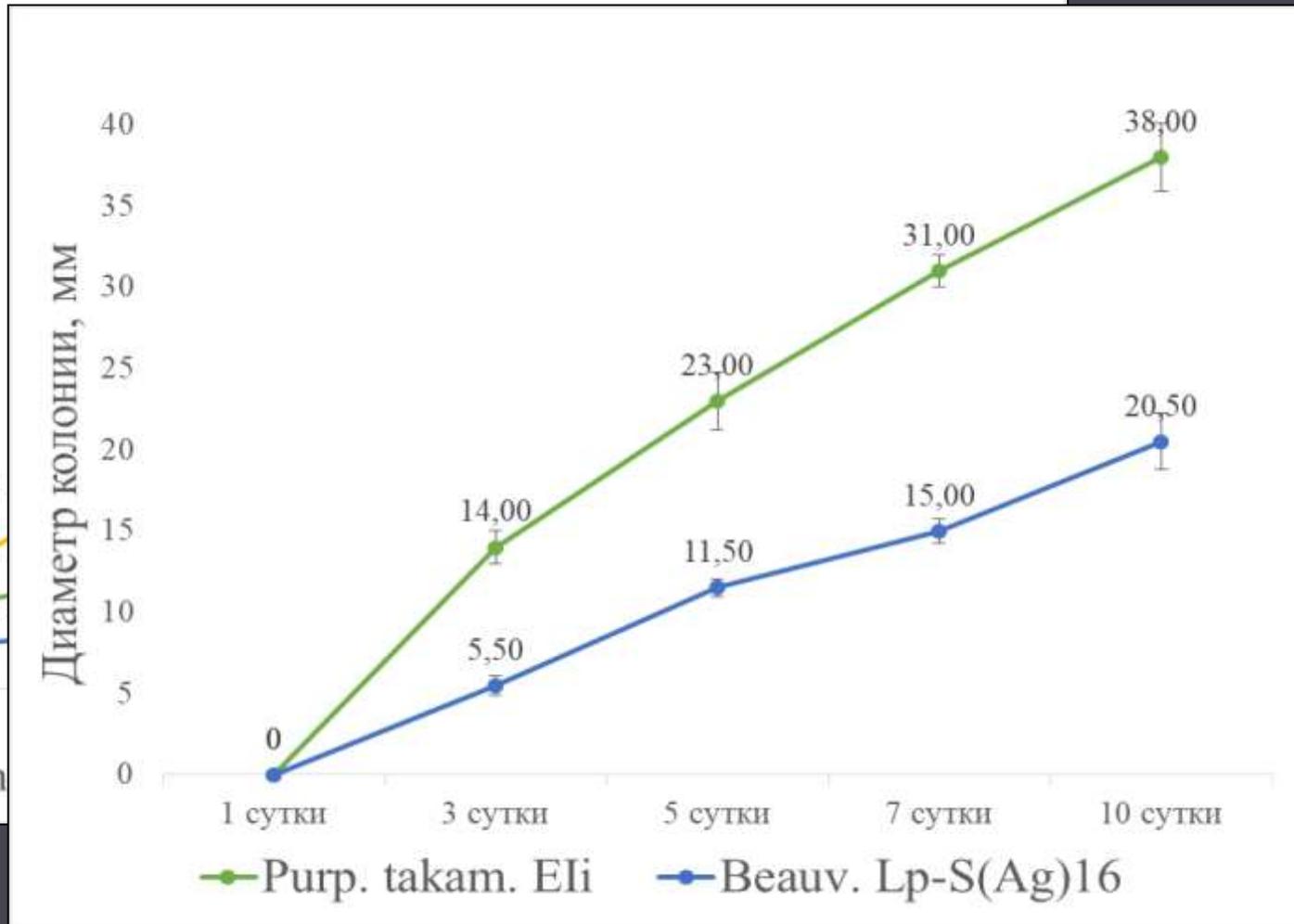


Рис. 17-18 Динамика роста изолятов *Conoideocrella luteorostrata* при 25°C; *Purpureocillium takamizusanense* и *Beauveria bassiana* s.l. при 28°C

Влияние соотношения углерода и азота в среде на размер колоний

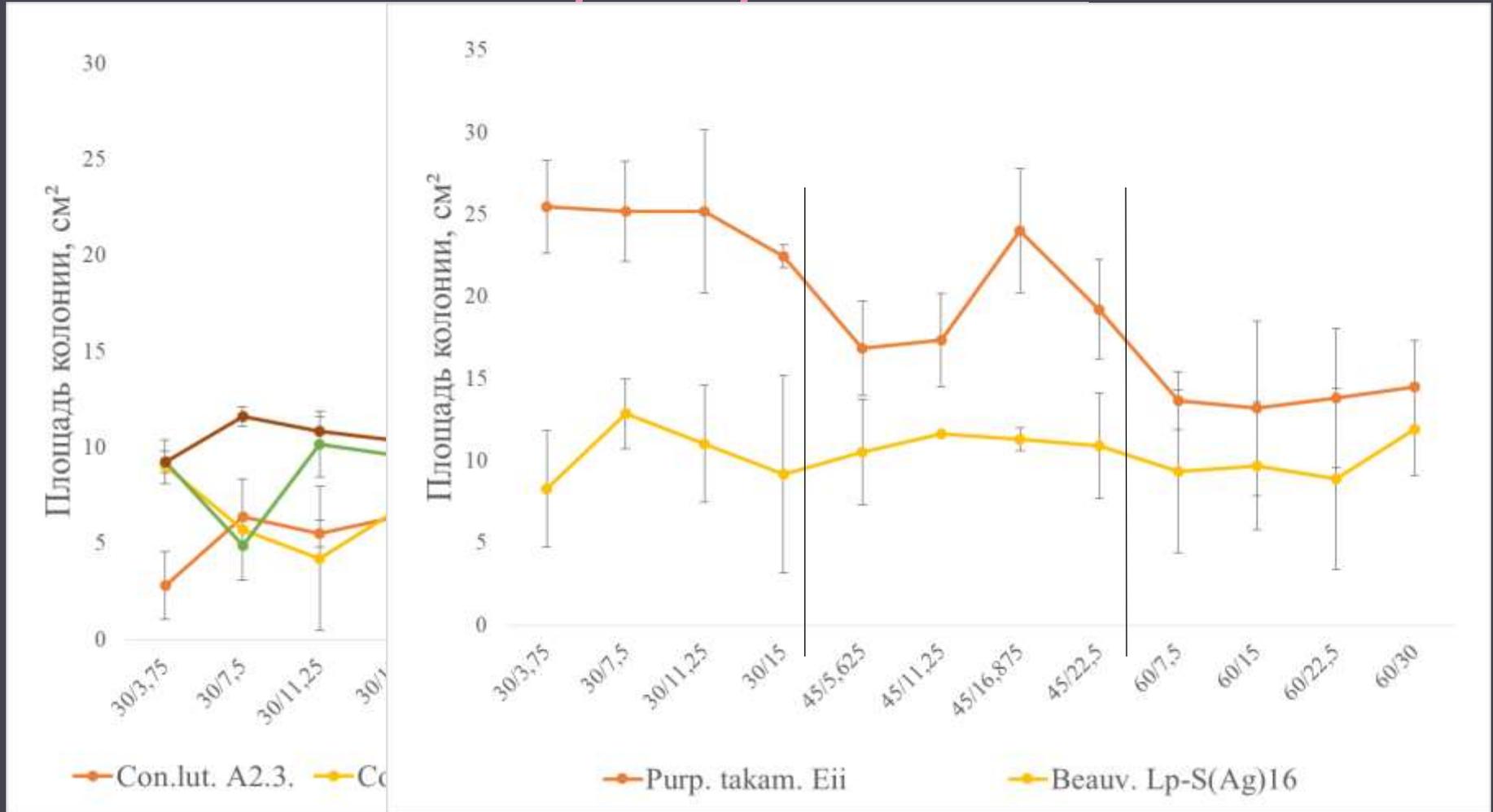


Рис. 17-18 Рост изолятов *Conoideocrella luteorostrata*; *Purpureocillium takamizusanense* и *Beauveria bassiana* s.l. на среде с различным соотношением глюкозы и пептона (в граммах на литр среды).

Динамика роста изолятов на различных источниках углерода и азота

Источники

углерода: D-

глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза и целлюлоза

Источники

азота: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 и пептон

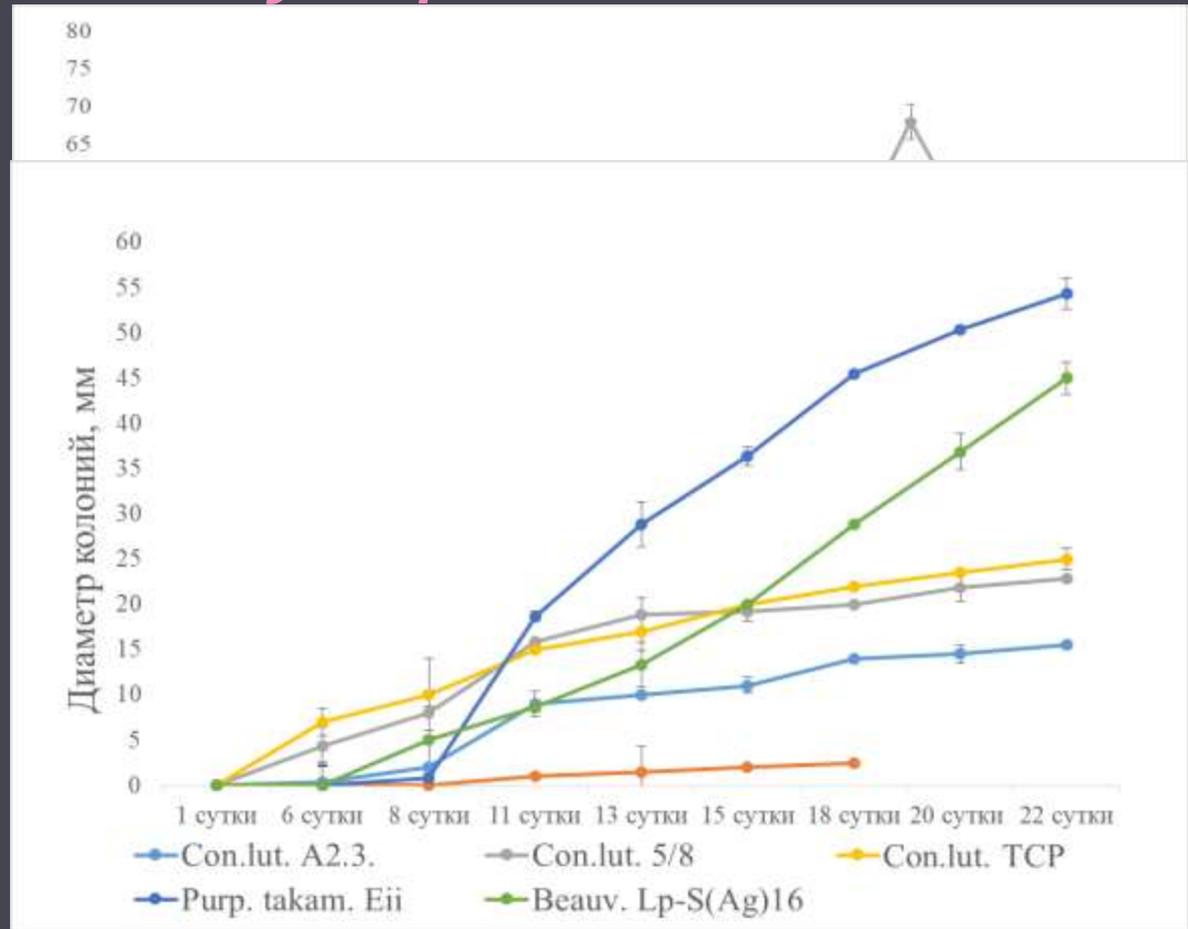


Рис. 19 Рост изолятов *Conoideocrella luteorostrata*; *Purpureocillium takamizusanense* и *Beauveria bassiana* s.l. на среде с добавлением фосфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Влияние показателя кислотности (pH) в питательной среде на рост и морфологию изолятов

*Conoideocrella
luteorostrata* (верхний
ряд)



Beauveria bassiana s.l.
(нижний ряд)



рост
нулевой

рост
нулевой

pH 2

pH 3

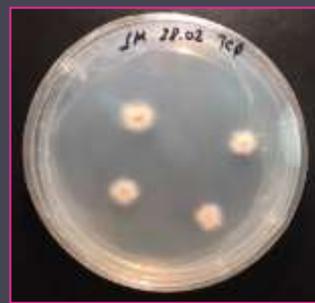
pH 4

pH 8

pH 9

pH 10

Рост изолятов на средах с различной доступностью воды и концентрацией соли



$a_w=0,97$
NaCl 0,5M

$a_w=0,94$
NaCl 1M

$a_w=0,86$
NaCl 2M

рост
нулевой
 $a_w=0,36$
NaCl 5M

*Purpureocillium
takamizusanense*
(верхний ряд)

*Conoideocrella
luteorostrata*
(нижний ряд)

Заключение

Conoideocrella luteorostrata – ценный энтомопаразитический гриб для разработки биоинсектицидов. Узкая специализация на белокрылке и щитовках. Южные и северные различаются по предпочтениям в источнике углерода.

Purpureocillium takamizusanense – поражает в юго-восточной Азии цикад, клопов и белокрылок. Выделенный краснодарский штамм может быть перспективным для практического использования. Ксеротолерант.

Beauveria bassiana s.l. – наиболее изученный вид, поражающий наземных членистоногих. Обнаруженный в Сочинском нац. парке нетипичный штамм этого вида может оказаться полезным для биотехнологических нужд. Есть особенности в трофических предпочтениях.

Выводы

1. Морфологические характеристики всех исследованных изолятов грибов полностью сопоставимы с типовыми описаниями этих видов.
2. Предел роста четырёх изолятов *Conoideocrella luteorostrata* находится в диапазоне 19-28°C с предполагаемым оптимумом в точке 25°C. Оптимум роста *Purpureocillium takamizusanense* и *Beauveria bassiana* s.l. смещён в область 25-28°C.
3. Предпочтительным источником азота в среде для всех изолятов гриба *Conoideocrella luteorostrata* является пептон. Для *P. takamizusanense* и *B. bassiana* s.l. – фосфат аммония ((NH₄)₂HPO₄). Подмосковные изоляты *C. luteorostrata* (*Con. lut.* А8.1. и *Con. lut.* А2.3.) в качестве источника углерода в среде предпочитают лактозу и целлюлозу. Южные изоляты (*Con. lut.* 5/8. и *Con. lut.* ТСП), *P. takamizusanense* и *B. bassiana* s.l. – лактозу и мальтозу.

Выводы

3. *C. luteorostrata* развивается при достаточно высоких концентрациях источника органического углерода и азота. *P. takamizusanense* – при низкой концентрации глюкозы, как и *B. bassiana* s.l. Рекомендуемое оптимальное соотношение углерод : азот для *P. takamizusanense* – 20 : 1. Для *Beauveria bassiana* s.l. существенных различий при росте на всех 12 вариантах не отмечено.
4. Оптимальным можно считать показатель pH 8 для изолята *Con.lut.* 5/8. Прочие изоляты требуют повторной проверки.
5. Все шесть исследуемых изолятов переносят содержание NaCl в среде от 0,5М до 1М. Колонии на среде с показателем доступности воды 0,97, 0,94 и 0,86 формировали лишь тропические изоляты *C. luteorostrata* (*Con. lut.* 5/8 и *Con. lut.* ТСП) и *P. takamizusanense*, что позволяет судить о ксеротолерантности этих штаммов.

Спасибо за внимание!

Благодарности

- Выражаю глубокую благодарность научным руководителям Борисову Борису Александровичу и Александровой Алине Витальевне;
- Благодарю своего рецензента Георгия Ремовича Леднёва за ценные замечания к работе;
- Выражаю признательность всему коллективу кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ.