

УДК 57.58.581.2:632.4

ВЛИЯНИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *Beauveria bassiana* НА РАЗВИТИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОРМОВЫХ БОБОВ (*Vicia faba*) В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

© 2021 г. Л. Ф. Ашмарина^{1,*}, Г. Р. Леднёв², О. Г. Томилова³, Т. А. Садохина¹, Д. Ю. Бакшаев¹, М. В. Левченко², Н. С. Волкова², М. В. Тюрин³, В. П. Данилов¹, член-корреспондент РАН В. В. Глухов³

Поступило 10.04.2021 г.

После доработки 20.04.2021 г.

Принято к публикации 23.04.2021 г.

Известно, что энтомопатогенные грибы способны выступать в качестве эндофитов. Показано, что гриб *Beauveria bassiana* (штамм ББК-1) успешно колонизировал растения кормовых бобов *Vicia faba* в лабораторных и полевых условиях. Реизолят *B. bassiana*, пропассированный через растения, обладал существенно более высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенных грибов в сравнении с исходным штаммом. Оценка влияния *B. bassiana* на развитие и распространенность комплекса болезней кормовых бобов в полевых условиях Западной Сибири показала, что предпосевная обработка семян энтомопатогеном уменьшала уровень зараженности семенного материала возбудителями, достоверно снижала развитие и распространенность корневых гнилей. Установлено снижение индекса развития болезней (шоколадная пятнистость, мучнистая роса, фузариоз и прочие пятнистости) в результате применения *B. bassiana*. Эффективность и пролонгированное действие *B. bassiana* на растения открывают новые возможности, как в создании биопрепаратов, так и в молекулярно-генетических исследованиях и селекции определенных пар растений и грибов по принципу наибольшего синергизма.

Ключевые слова: *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Vicia faba* L., энтомопатогенные грибы, эндофиты, фитопатогены, антагонистическая активность

DOI: 10.31857/S268673892104003X

ВВЕДЕНИЕ

С конца 90-х годов XX века было показано, что микромицеты, известные как энтомопатогены (представители р. *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Lecanicillium*), способны выступать в качестве эндофитов [1, 2]. К настоящему времени имеется значительное количество сообщений об обнаружении грибов этой группы, как в культурных, так и в дикорастущих растениях [3]. Существует также большое число публикаций по успешной искусственной колонизации энтомопатогенными грибами различных двудольных и однодольных растений [1]. Показано, что присутствие в расте-

ниях эндофитных форм энтомопатогенных грибов оказывает негативное влияние на насекомых-фитофагов и фитопатогенов (бактерий и грибов) [4, 3], а в ряде случаев приводит к ростстимулирующему эффекту на растениях [2].

Кормовые бобы *Vicia faba* L. занимают третье место среди возделываемых зернобобовых культур [5]. Потери в производстве бобовых от болезней могут достигать 70–80% [6]. Известно более ста возбудителей болезней этих культур [7]. В условиях континентального климата Западной Сибири бобовые поражаются целым комплексом болезней: корневые гнили (виды р. *Fusarium*, *Alternaria*), пятнистости листьев (виды р. *Fusarium*, *Alternaria*), мучнистая роса (*Erysiphe communis* (Wallr.) Grev. f. *faba* Jacz.), шоколадная пятнистость (*Botrytis fabae* Sard.) [8]. В связи с этим необходимо проводить поиск и разработку экологически безопасных подходов при выращивании бобовых. Хорошо известно, что энтомопатогенные грибы р. *Beauveria* могут успешно колонизировать бобовые культуры [9]. Однако в основном результаты были получены только в лабораторных условиях. А в полевых, в том числе в условиях

¹ Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт систематики и экологии животных Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*e-mail: alf8@yandex.ru

континентального климата России, имеются лишь единичные работы в этом направлении, но по другим культурам [10]. Следует отметить, что в полевых условиях растения обычно поражаются целым комплексом патогенов. В связи с этим целью наших исследований была оценка возможности колонизации кормовых бобов штаммом гриба *B. bassiana* и его антагонистическая активность к фитопатогенам в лабораторных условиях, а также его влияния на комплекс основных болезней в агроценозе данной культуры в Западной Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований являлся штамм гриба *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (ББК-1), изолированный из трупа итальянского пруса *Calliptamus italicus* L., собранного в Карасукском р-не Новосибирской обл. из коллекции ФБГНУ ВИЗР. Для оценки антагонистической активности был взят реизолят этого штамма (ББК-1(Re)), пропассированный через растения бобов. Видовая и внутривидовая идентификация *B. bassiana* проводилась по межгенному локусу В (Bloc). Для лабораторных опытов гриб выращивали в чашках Петри на агаризированной среде Сабуро. Конидиальную массу для полевого эксперимента нарабатывали методом двухфазного культивирования (первая фаза в глубинной культуре на среде Сабуро, вторая — поверхностно на лущеном зерне ячменя). Титр — 5×10^9 конидий/г.

В опытах использовали семена бобов (*V. faba*) сорт “Русский черный” (лаборатория) и “Сибирские” (полевые условия).

В лабораторных условиях растения выращивали на стерильной почвенно-песчаной смеси (соотношение 1:1). Инокуляцию проводили методом замачивания семян в суспензии конидий, пролива почвы (5 мл/растение) и опрыскивания вегетирующих растений (до полного его смачивания) по стандартным методикам [11]. Титр — 5×10^7 конидий/мл. Оценку эндофитной колонизации растений (в ходе лабораторного и полевого экспериментов) и выделение реизолятов (лабораторный опыт) проводили согласно [12]. Количественную оценку КОЕ в почве ризосферы (полевой опыт) проводили по методикам, описанным ранее [10].

Оценку антагонистической активности штамма ББК-1 *B. bassiana* и реизолята ББК-1(Re) проводили *in vitro* в отношении грибных фитопатогенов из р. *Fusarium oxysporum* (штамм 4.5), *F. solani* (4.9), *Rhizoctonia* sp. (6.2), *Bipolaris sorokiniana* (2.7) и *Botrytis cinerea* (3.4) (из рабочей коллекции ВИЗР) по методике совместного культивирования [13]. Ингибирующую активность (ИА) *B. bassiana* оценивали по изменению диаметра колоний

фитопатогена в присутствии *B. bassiana* в сравнении с контролем [14].

Полевые исследования проводили в 2020 г. на стационаре Сибирского института кормов СФНЦА РАН (Новосибирская область, 54°55'N, 82°56'E). Тип почвы — чернозем выщелоченный, среднемогучный, среднесуглинистый, содержание органического углерода в почве 3.48%, pH — 5.3. Семена кормовых бобов инокулировали суспензией конидий *B. bassiana* с титром 5×10^7 конидий/мл из расчета 2.5 л на 20 кг семян. На пятый день после обработки был проведен их микологический анализ по стандартным методикам. Визуальные учеты поражения растений различными заболеваниями проводили в поле на 28-й (корневые гнили) и 80-й (листочкостеблевые болезни) день после посева. Через 28 дней после посева отбирали растения для микологического анализа на пораженность возбудителями корневых гнилей.

Нормальность распределения данных проверяли с помощью W критерия Шапиро—Уилка. Нормально распределенные данные анализировали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Ненормально распределенные данные были проанализированы с помощью теста Манна—Уитни. Для сравнения доли колонизации семян и растений грибами использовали точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В лабораторных условиях при всех трех способах инокуляции бобов грибом *B. bassiana* уровень колонизации был достаточно высок — 67, 78 и 78% соответственно. Статистически достоверных различий между вариантами не было ($p \geq 0.3$). Анализ уровня локализации гриба при разных способах колонизации показал значительные различия по данному показателю. При обработке семян гриб был зафиксирован в корнях и стеблях растений (58 и 42% соответственно). При проливе почвы он был локализован во всех проанализированных частях растений, хотя на листья приходилось лишь 8%. При обработке вегетирующих растений гриб был зафиксирован преимущественно в стеблях и листьях (56 и 40%). Для дальнейших полевых испытаний была выбрана инокуляция семян водной суспензией конидий как более технологичный и менее затратный способ.

Оценка антагонистической активности гриба *B. bassiana* (ББК-1) *in vitro* показала, что выбранный для полевого эксперимента штамм способен ингибировать рост ряда почвенных фитопатогенов (*F. oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans, *F. solani* (Mart) App. et Wr., *Rhizoctonia* spp., *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *B. cinerea* Pers.). ИА штамма ББК-1 составила 22.6—44.4% в зависимости от вида фитопатогена (рис. 1). Антагонистические

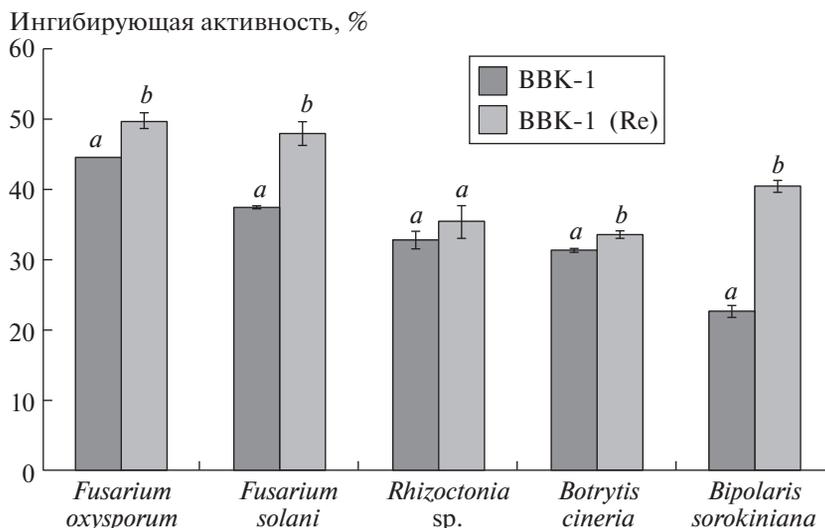


Рис. 1. Ингибирующая активность штаммов *B. bassiana* в отношении фитопатогенов (15-е сутки совместного роста). Разными буквами отмечено наличие достоверных различий в сравнении с исходным штаммом (t -тест, $p < 0.05$).

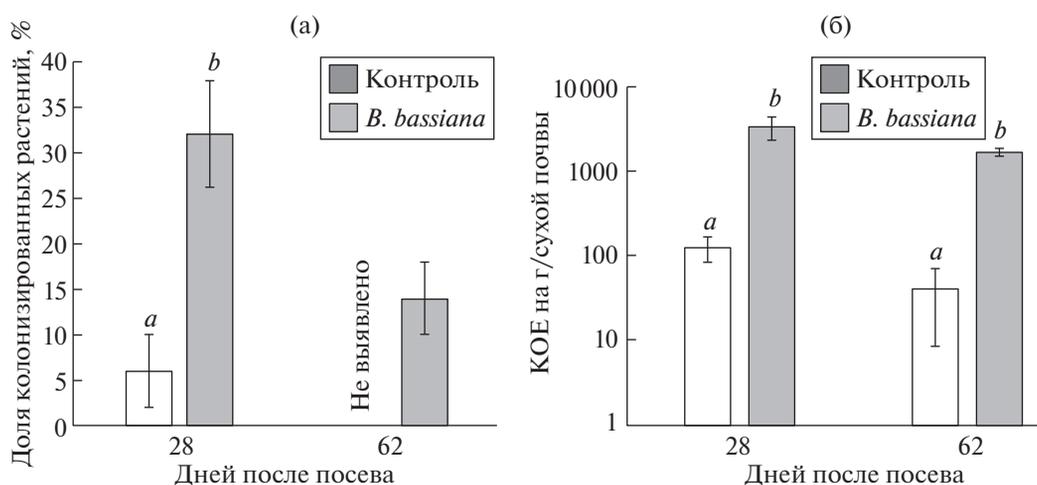


Рис. 2. Колонизация растений бобов и ризосферной почвы *B. bassiana*. Разными буквами отмечено наличие достоверных различий в сравнении с исходным штаммом (Манна–Уитни тест, $p < 0.05$).

свойства реизолята, полученного из растений бобов, были достоверно выше в отношении всех оцениваемых культур фитопатогенов (t -тест, $p \leq 0.01$), за исключением *Rhizoctonia sp.*

Анализ подземных частей растений в полевом эксперименте на присутствие в них *B. bassiana* показал относительно невысокий уровень эндофитной активности гриба. В фазу стеблевания (28 дней после посева) было колонизировано только 32% растений, а в период цветения (62 дня после посева) лишь 14% (рис 2а).

При этом в почве ризосферы гриб присутствовал в достаточно высокой плотности (в течение двух месяцев после инокуляции выше 1×10^4 КОЕ/г сухой почвы) (рис. 2б).

Инокулированные для данного эксперимента семена бобов *B. bassiana* изначально были довольно сильно инфицированы возбудителями корневых гнилей: *Alternaria* – 57.0%, *Fusarium* – 8.0%.

Анализ зараженности посевного материала показал, что обработка семян бобов конидиями *B. bassiana* угнетала развитие патогенов (табл. 1).

Биологическая эффективность обработки в отношении грибов р. *Alternaria* и *Fusarium* на семенах составила 64.9%. Существенный уровень достоверности получен в снижении зараженности семян только грибами р. *Alternaria* (точный тест Фишера, $p < 0.0001$).

Установлено, что обработка семян *B. bassiana* приводит к снижению развития корневых гнилей

Таблица 1. Влияние предпосевной обработки семян бобов конидиями *B. bassiana* на их зараженность фитопатогенами (среднее по повторности \pm ошибка ср.)

Вариант	Доля семян, заселенных грибными патогенами, %				
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>
Контроль	60.71 \pm 5.35	8.14 \pm 3.76	5.43 \pm 3.18	1.43 \pm 1.43	16.29 \pm 5.74
<i>B. bassiana</i>	21.29 \pm 5.46*	2.86 \pm 1.91	2.43 \pm 1.65	4.29 \pm 4.29	9.71 \pm 5.70

* – наличие достоверных различий в сравнении с контрольным вариантом (точный тест Фишера, $p < 0.0001$).

Таблица 2. Анализ подземных органов бобов на зараженность возбудителями корневых гнилей (среднее по повторности \pm ошибка ср.)

Вариант	Количество колоний в чашке Петри				
	<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Mucor</i>	Прочие
Контроль	8.00 \pm 0.55	2.40 \pm 0.81	1.00 \pm 0.32	–	0.40 \pm 0.25
<i>B. bassiana</i>	6.80 \pm 0.66	0.60 \pm 0.25*	0.40 \pm 0.25	0.40 \pm 0.25	–

* – наличие достоверных различий в сравнении с контрольным вариантом (точный тест Фишера, $p = 0.01$).

на ранних стадиях роста растений (4 нед. после посадки) (рис. 3).

У растений, инокулированных *B. bassiana*, индекс развития болезни (ИРБ) был в 2.37 раза ниже в сравнении с контролем (тест Манна–Уитни, $p = 0.01$). Статистически значимые различия наблюдались также и при оценке распространенности корневых гнилей на подземных органах бобов ($p = 0.01$). Биологическая эффективность обработки семян *B. bassiana* в снижении развития инфекции составила 57.78%.

Из подземных органов растений бобов были изолированы преимущественно грибы р. *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* (табл. 2), что подтверждает их участие в этиологии заболеваний бобов.

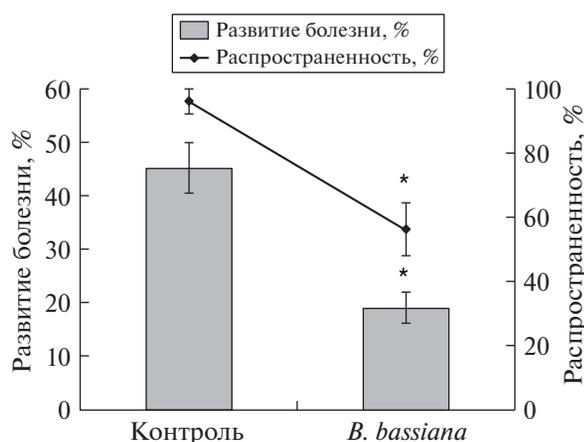


Рис. 3. Развитие и распространенность корневых гнилей подземных органов бобов (среднее по повторности \pm ошибка ср.). * – наличие достоверных различий в сравнении с контрольным вариантом (Манна–Уитни тест, $p < 0.05$).

Обработка семян *B. bassiana* оказывала существенное влияние только на инфицирование видами р. *Alternaria*, вызывая 4-кратное снижение зараженности (точный тест Фишера, $p = 0.01$). Также отмечено несущественное снижение численности грибов р. *Cladosporium* и *Fusarium* (2.5 и 1.18 раза соответственно). Таким образом, несмотря на изначальную зараженность семян и инфицирование корневой системы почвенными фитопатогенами, обработка семенного материала *B. bassiana* оказала значительный защитный эффект.

Выявлено существенное влияние *B. bassiana* на проявление различных листовых болезней, максимальное развитие которых зафиксировано в фазу молочной спелости (рис. 4).

ИРБ мучнистой росы в контроле в 2.1 раза выше, чем в опытном варианте (Манна–Уитни тест, $p = 0.0001$). Для шоколадной пятнистости при использовании *B. bassiana* также отмечено статистически значимое снижение развития болезни (в 2.2 раза) ($p = 0.0005$). Наблюдения за развитием фузариоза показали, что снижение ИРБ составило 2.3 раза, хотя и не являлось статистически значимым ($p = 0.28$). Статистически значимые различия между контролем и вариантом с обработкой *B. bassiana* выявлены по развитию листовых пятнистостей, вызываемых комплексом грибов из рода *Alternaria*, *Cladosporium* и *Fusarium* ($p < 0.0001$).

В результате проведенных исследований в континентальных условиях Западной Сибири мы впервые установили, что обработка семян кормовых бобов *V. faba* грибом *B. bassiana*, выращенных в полевых условиях, повышает устойчивость растений к комплексу заболеваний. Растения, после обработки *B. bassiana*, в меньшей степени пора-

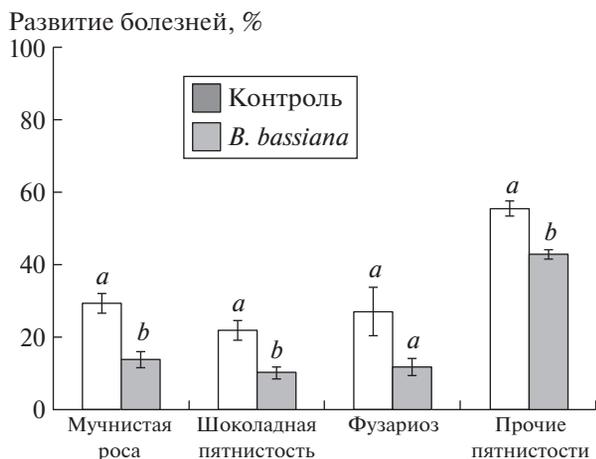


Рис. 4. Интенсивность развития листовых болезней бобов в фазу молочной спелости бобов (среднее значение по растению). Разными буквами отмечено наличие достоверных различий в сравнении с контрольным вариантом (Манна–Уитни тест, $p < 0.05$).

жались корневыми гнилями, мучнистой росой, шоколадной и другими пятнистостями. Этот эффект мы наблюдали в течение всего периода вегетации бобов.

Аналогичные исследования были проведены на различных видах других растений, но в основном в лабораторных условиях, где не регистрировался комплекс заболеваний [15]. Следует также отметить, что эндофитные взаимоотношения между грибом *B. bassiana* и растениями, в данном случае с бобами, могут носить факультативно-мутуалистический характер. С одной стороны, снижается повреждаемость растений насекомыми и фитопатогенами [16], с другой, энтомопатогенные грибы получают дополнительный источник питательных веществ и, за счет локализации в прикорневой зоне (ризосфере) или в тканях растений, могут длительно персистировать в ценозах [17].

Стоит отметить, что энтомопатогенные грибы могут подавлять развитие фитопатогенов в растениях-хозяевах в результате конкуренции и микопаразитизма (своеобразный антибиоз) [4], за счет синтеза первичных и вторичных метаболитов, ферментов [14]. Хорошо известно, что ряд вторичных метаболитов *B. bassiana*, в частности ооспорейн и боверин, обладают ярко выраженной фунгицидной активностью [18, 19].

Ранее было показано, что данный гриб экспрессирует антимикробный пептид (VbAFP1), локализирующийся в клеточной стенке конидий, затем пептид высвобождается наружу и подавляет рост конкурирующих грибов, в частности *Alternaria brassicae* [20]. Второй механизм подавления фитопатогенов может быть основан на индуцировании системной резистентности с одновременной стимуляцией роста растений [4, 21]. Можно

предположить, что обработка растений, в данном случае семян, энтомопатогенным грибом запускает несколько физиологических механизмов, приводящих к повышенной устойчивости против комплекса патогенов в течение всего периода вегетации. Эффективность и пролонгированное действие *B. bassiana* на растения открывают новые возможности, как в создании биопрепаратов, так и в молекулярно-генетических исследованиях и селекции определенных пар растений и грибов по принципу наибольшего синергизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vega F.E. Insect pathology and fungal endophytes // J. Invertebr. Pathol. 2008. V. 98. № 3. P. 277–279.
2. Hu S., Bidochka M.J. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi // J. Appl. Microbiol. 2021. V. 130. № 2. P. 570–581.
3. Vega F.E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review // Mycologia. 2018. V. 110. № 1, P. 4–30.
4. Ownley B., Gwinn K., Vega F. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution // BioControl. 2010. V. 55. P. 113–128.
5. Sing A.K., Bharati R., Pedapati A. An assessment of faba bean (*Vicia faba* L.) current status and future prospect // African J. of Agricultural Research. 2013. V. 8. № 50. P. 6634–6641.
6. Horoszkiewicz-Janka J., Jajor E., Korbas M. Potential risk of infection of pathogenic fungi to legumes (Fabales) and possibilities of their control // Prog. Plant Protect. 2013. V. 53. P. 762–767.
7. Hebblethwaite P.D. The Faba Bean // Butterworths, London, U.K., 1983.
8. Ашмарина Л.Ф., Горобей И.М., Коняева Н.М., и др. Атлас болезней кормовых культур в Западной Сибири. Новосибирск, 2010.
9. Akutse K.S., Maniania N.K., Fiaboe K.K., et al. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life – history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) // Fungal Ecology. 2013. V. 6. P. 293–301.
10. Tomilova O.G., Shaldyaeva E.M., Kryukova N.A., et al. Entomopathogenic fungi decrease *Rhizoctonia* disease in potato in field conditions // Peer J. 2020. V. 8. P. e9895.
11. Gurulingappa P., Sword G.A., Murdoch G., et al. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta // Biol. Control. 2010. V. 55. P. 34–41.
12. Parsa S., Ortiz V., Vega F.E. Establishment of fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control // J. Vis. Exp. 2013. V. 11. № 74. P. 50360.
13. Sobowale A.A., Odebode A.C., Cardwell K.F., et al. Antagonistic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and *T. hamatum* resident on maize (*Zea mays*) plant against *Fusarium verticillioides* (Nirenberg) isolated from rot-

- ting maize stem // Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2010. V. 43. P. 744–753.
14. Barra-Bucarei L., Iglesias A.F., González M.G., et al. Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two solanaceae crops // Microorganisms. 2020. V. 8. № 1. P. 65.
 15. Jensen R.E., Enkegaard A., Steenberg T. Increased fecundity of *Aphis fabae* on *Vicia faba* plants following seed or leaf inoculation with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* // PLoS One. 2019. V. 14. № 10. P. e0223616.
 16. White J.F., Belanger F., Meyer W., et al. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes-development of symbiotic interactions with plants // Symbiosis. 2002. V. 33. № 3. P. 201–213.
 17. Berg G., Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere // FEMS Microbiol Ecol. 2009. V. 68. № 1. P. 1–13.
 18. Wang Q., Xu L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review // Molecules. 2012. V. 17. № 3. P. 2367–2377.
 19. Nagaoka T., Nakata K., Kouno K., et al. Antifungal Activity of Oosporein from an Antagonistic Fungus against *Phytophthora infestans* // Zeitschrift für Naturforschung. 2004. V. 59. № 3–4. P. 302–304.
 20. Tong S., Li M., Keyhani N.O., Liu Y., et al. Characterization of a fungal competition factor: production of a conidial cell-wall associated antifungal peptide // PLOS Pathogens. 2020. V. 16. № 4. P. e1008518.
 21. Raad M., Glare T.R., Brochero H.L., et al. Transcriptional reprogramming of *Arabidopsis thaliana* defence pathways by the entomopathogen *Beauveria bassiana* correlates with resistance against a fungal pathogen but not against insects hormones, plant–microbe interaction, *Plutella xylostella*, *Myzus persicae*, *Sclerotinia sclerotiorum* // Frontiers in Microbiology. 2019. V. 10. P. 615.

EFFECT OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Beauveria bassiana* ON THE DEVELOPMENT OF FABA BEAN (*Vicia faba*) DISEASES IN THE FIELD CONDITIONS

**L. F. Ashmarina^{a, #}, G. R. Lednev^b, O. G. Tomilova^c, T. A. Sadokhina^a, D. Yu. Bakshaev^a,
M. V. Levchenko^b, N. S. Volkova^b, M. V. Tyurin^c, V. P. Danilov^a,
and Corresponding Member of the RAS V. V. Glupov^c**

^a Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies (SFSCA) of the RAS, Novosibirsk, Russian Federation

^b All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russian Federation

^c Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

[#]e-mail: alf8@yandex.ru

Several ascomycetous entomopathogenic fungi, including species in the genera *Beauveria*, are plant symbionts/endophytes and are termed as endophytic insect-pathogenic fungi. It was shown that the fungus *Beauveria bassiana* (BBK-1 strain) successfully colonized *Vicia faba* bean plants in laboratory and field conditions of Western Siberia. The *B. bassiana* reisolated passed through the plants had significantly higher antagonistic activity against phytopathogens in comparison with the primary stem of entomopathogenic fungi. Pre-sowing faba bean seeds treatment reduced the level of infection of the seed material with phytopathogens, significantly decrease the development and prevalence of root rot disease. A decrease in the disease development index (chocolate spot, powdery mildew, fusariosis and other spots diseases) was found as a result of the use of *B. bassiana*. The effectiveness and prolonged action of *B. bassiana* on plants opens up new opportunities, both in the creation of biological products, and in molecular-genetic research and selection of certain pairs of plants and fungi on the principle of the greatest synergy.

Keywords: *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Vicia faba* L., entomopathogenic fungi, endophytes, phytopathogens, antagonistic activity