

DOI 10.33952/2542-0720-2021-3-27-20-34

УДК 632.937

Бондарчук Е. Ю., Цыгичко А. А., Асатурова А. М.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ЭНТОМОПАТОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОТНОШЕНИИ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ *IN VITRO* (ОБЗОР)

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»

Реферат. Чрезмерная интенсификация аграрной деятельности химическими инсектицидами привела к ряду серьезных проблем, угрожающих окружающей среде и здоровью человека. Одним из путей их решения является переориентация на применение препаратов на основе энтомопатогенных биоагентов. Целью данного обзора является поиск и систематизация методических подходов к определению энтомопатогенной активности микроорганизмов различных таксономических групп в лабораторных условиях. Целесообразность выбора необходимого метода при изучении того или иного явления или процесса является важным моментом как в фундаментальной сфере исследований, так и в прикладной. Первичная оценка энтомопатогенной активности микроорганизмов *in vitro* лежит в основе расширения спектра их действия, введения новых штаммов в коллекции, а также способствует пополнению знаний об уже известных свойствах различных видов микроорганизмов. Все это безусловно связано с дальнейшим выбором их в качестве биологических агентов. Каждая из представленных групп энтомопатогенов имеет свои отличительные особенности механизмов действия, детерминированные целевым насекомым. В отношении выбора методических подходов оценки энтомопатогенного действия грибов авторы опирались на физиологические особенности насекомого и его стадию вредоносности. Изучая активность штаммов бактерий, исследователи руководствовались методическими подходами перорального заражения насекомых, используя инфицированный источник питания, и отмечали патологические изменения в клеточной структуре, а также деформации элементов кишечника. Наиболее распространенным способом оценки действия энтомопатогенных вирусов в лабораторных условиях является метод поверхностного заражения источника питания тестируемого насекомого, учитывая высокую специализацию агента. При изучении механизмов действия грибных, бактериальных и вирусных агентов, исследователи вводили в тело насекомого инъекции с суспензией патогена. Поиск и систематизация актуальных методических подходов для оценки энтомопатогенных микроорганизмов в зависимости от таксономической принадлежности является важной частью работы, непосредственно связанной с разработкой качественного и эффективного биоинсектицида.

Ключевые слова: методические подходы, энтомопатогенные микроорганизмы, энтомопатогенное действие, бактерии, грибы, вирусы.

Для цитирования: Бондарчук Е. Ю., Цыгичко А. А., Асатурова А. М. Методические подходы к оценке энтомопатогенной активности микроорганизмов в отношении насекомых-вредителей *in vitro* (обзор) // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 3(27). С. 20–34. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-3-27-20-34.

For citation: Bondarchuk E. Yu., Tsygichko A. A., Asaturova A. M. Methodological approaches to the assessment of the entomopathogenic activity of microorganisms against insect pests *in vitro* (review) // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2021. No. 3(27). P. 20–34. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-3-27-20-34.

Введение

Ожидается, что к 2050 г. население мира достигнет 9,8 млрд человек. В современном аграрно-промышленном комплексе существует необходимость

повышения урожайности сельскохозяйственных культур прибыльным, эффективным и устойчивым образом. Одним из факторов, ограничивающих продуктивность сельского хозяйства, являются насекомые-вредители, болезни и сорняки. Это является важным лимитирующим фактором для обеспечения населения продовольствием в ближайшие 40–50 лет [1, 2].

Популяции многих членистоногих естественным образом регулируются энтомопатогенами, такими как бактерии, грибы и вирусы. Эти представители биологического контроля широко распространены в агроценозах и вызывают естественные инфекции у многих видов вредителей. Большинство видов из представленных групп микроорганизмов выступают основой биоинсектицидов, которые действуют избирательно и снижают вредоносность определенного спектра фитофагов, сохраняя природное равновесие. Возможности биоконтроля расширяются с увеличением объема научных знаний и могут быть использованы в соответствии с экономическими и социальными потребностями.

Исследования перспективных энтомопатогенов в лабораторных условиях является неотъемлемым этапом создания нового продукта. Инсектицидная активность имеет решающее значение при отборе микроорганизма в качестве агента биологического контроля. Данный показатель определяется степенью способности к паразитизму в отношении насекомых-вредителей сельскохозяйственных культур. При этом биологическая активность имеет важнейшее значение не только на начальных этапах создания биоинсектицида (выделение из природных источников и отбор), но и по окончанию биотехнологического процесса для определения качества продукта и его стандартизации. Кроме того, исследования *in vitro* напрямую связаны с пополнением коллекций перспективными штаммами, изучением их физиологии и биохимии, а также механизмов действия в отношении целевого объекта.

Первичная оценка энтомопатогенной активности микроорганизмов *in vitro* лежит в основе расширения спектра действия грибных, бактериальных и вирусных штаммов, введения новых штаммов в коллекции, а также способствует пополнению знаний об уже известных свойствах различных видов микроорганизмов. Это связано с дальнейшим выбором их в качестве биологических агентов для разработки новых высокоэффективных биопрепаратов против вредителей. Таким образом, необходимы исследования с использованием актуальных методических подходов, где качественное проведение экспериментальных работ напрямую зависит от достоверности полученных данных. Следует указать, что исследование влияния энтомопатогенных микроорганизмов на популяции вредителей в зависимости от их таксономической принадлежности требует специального подхода к оценке их эффективности.

Цель данного обзора – поиск и систематизация методических подходов к определению энтомопатогенной активности микроорганизмов различных таксономических групп в лабораторных условиях.

Материалы и методы исследований

Исследование построено на поиске и анализе литературных источников с преимущественной ретроспективой 10 лет. В результате отобраны научные работы, релевантные предмету и цели поиска. В работе применены методы сравнения и обобщения. В исследованиях использована материально-техническая база УНУ “Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения” (<http://ckp-rf.ru/> реестровый № 67136).

Результаты и их обсуждение

Энтомопатогенные грибы, бактерии и вирусы являются перспективными агентами биологического контроля и играют важную роль в регуляции численности вредителей сельскохозяйственных культур. Каждая из этих таксономических групп

патогенов имеет свои отличительные особенности механизмов действия, детерминированные прежде всего целевым насекомым.

Грибные энтомопатогенные агенты, используемые в защите сельскохозяйственных культур от насекомых-вредителей, представлены в большинстве случаев родами *Beauveria* и *Metarhizium* [3]. К примеру, на российском рынке средств защиты растений представлен и активно применяется препарат «Метаризин» на основе штамма *M. anisopliae* P-72 [4]. Выбор перспективного агента – основы биоинсектицида производят по критерию высокой вирулентности. Для отбора высокоэффективного изолята в отношении определенного вида или рода насекомых необходимы лабораторные исследования, которые осуществляют в несколько этапов.

Важным аспектом при планировании экспериментальной работы является выбор способа заражения насекомого: каким образом будет происходить контакт с культурой гриба. При инокуляции искусственной питательной среды (ИПС), конидиальную суспензию авторы наносили на поверхность агаризованной среды с помощью аэрографа SAGYMA®, из расчета 1 мл суспензии на 24-х луночную пластину. Затем личинки переносили индивидуально в лунки с помощью тонкой кончиковой щетки (No.2) [5]. Для изучения механизма действия грибного агента, в своих работах Ренвик Ю. и Дубовский И. М. с соавторами, вводили инъекции изолята *B. bassiana* Sar-31 в гусеницу большой восковой моли в гемоцель 3-20 мкл суспензии через последнюю про-ножку. В качестве шприца использовали газонепроницаемый шприц SGE 1 мл (ScientificPty. Ltd., Мельбурн, Австралия) диаметром 0,75 мм [6, 7].

Ученые из технологического университета Кейп-Пенинсула определяли заражаемость яиц яблонной плодовой гусеницы энтомопатогенными изолятами грибов *M. robertsii* MTL 151 и GW 461. Предварительно перед откладкой яиц обрабатывали вошеную бумагу 5 мл суспензии с 0,05 % Твина 80. Листам давали высохнуть при температуре 20 °С и 50–60 % относительной влажности в течение одного часа и переносили в места спаривания взрослых особей. Бумагу укладывали обработанной поверхностью вверх. После откладки листья извлекали и определяли количество яиц с помощью микроскопа. Наблюдали количество отродившихся особей [8]. Некоторые исследователи при обработке суспензиями на основе грибов плодов или растений, которыми питаются насекомые и/или на которые откладывают яйца, погружали их в ёмкость с суспензией на 2 ч, а затем переносили в ёмкость с прилипателем (Твин 80) [8–10]. В исследованиях Asomiba R. A. наносили суспензию сразу с добавлением 0,05 % Твина 80 на поверхность плода с помощью распылителя из расчета 4–10 мл/плод [8]. Обработанные такими способами плоды/растения использовали после полного высыхания. В ходе исследований оценивали количество проколов (при питании), количество посещений конкретных плодов (при оценке предпочтения), количество личинок внутри плода/растения (при оценке откладки яиц, активности личинок, процент повреждения) [8–10].

В исследованиях с инфицированием активно питающихся гусениц яблонной плодовой гусеницы почвенными грибами (*Beauveria spp.* и *M. anisopliae*) производили непосредственный контакт с почвой. Для этого заранее отобранные образцы грунта просеивали через металлическое сито с размером ячеек 4 мм [11, 12]. Затем их переносили в прозрачные пластиковые горшки с перфорированными крышками. Гусениц пятого возраста помещали на поверхность каждого контейнера с образцами почвы и инкубировали в темноте при температуре 25 °С. Контейнеры ежедневно переворачивали вверх дном в течение первой недели, чтобы увеличить контакт между насекомыми и частицами почвы. Образцы проверяли на наличие погибших

особей каждые три–четыре дня в течение трех недель. Мертвых гусениц подвергали поверхностной стерилизации 70 %-м этанолом с последующей инкубацией во влажной камере при температуре 25 °С [8]. Для инфицирования куколок или личинок последнего возраста *Spodoptera littoralis* использовали конические пластиковые стаканчики емкостью 200 см³, которые заполняли почвой. В почву добавляли по 2 мл суспензии штамма *Isaria fumosorosea* ССМ 8367 и изолированно помещали личинок на поверхность почвы, а куколок внедряли в почву на глубину 2–3 см. Учёты проводили каждые три дня для наблюдения за развитием грибной инфекции, регистрировали количество погибших насекомых и продолжительность их жизни. Влажность почвы поддерживали на уровне 70 % на протяжении всего эксперимента [13].

Однако в литературных источниках самым распространенным способом заражения насекомых остаётся контакт с грибным биоагентом. Так, авторы помещали гусениц яблонной плодовой гнили в ёмкость с раствором, содержащим грибную культуру, в опытном варианте и 0,01–0,02 % раствор Твина 80 в контрольном на 5–30 с. Индивидуально обработанных таким образом особей переносили в чашки Петри с влажными кусочками ваты для увеличения скорости роста и спорообразования грибов. При необходимости насекомых снабжали искусственными или естественными источниками питания [8, 13–15].

В работах по исследованию адгезии и прорастания энтомопатогенных грибов на поверхности кутикулы производили обработку только внешних покровов *Rhipicephalus sanguineus*. Для этого насекомых заражали путем погружения в суспензию на 5 мин. Через месяц штаммы грибов повторно выделили с поверхности насекомого и суспендировали в стерильной дистиллированной воде, содержащей 0,01 % Тритона X-100. Затем суспензию фильтровали и полученный осадок обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин (Ультразвуковой очиститель D80H, ChemistCo., TaipeiHsien, Тайвань), чтобы разбить комки конидий. Концентрацию конидий определяли с помощью гемоцитометра. Для исследований на наличие спор, насекомое несколько раз промывали стерильной дистиллированной водой и выращивали на декстрозном агаре Сабуро [16, 17].

Для оценки влияния эпикутикулярных липидов на прорастание гриба, насекомых замораживали и липиды последовательно экстрагировали *n*-пентаном (99,9%, Uvasol®, Merck, Германия) и дихлорметаном (DCM, 99,9 % GC grade, Bio-LabLtd., Израиль). Насекомых погружали в пентан на 5 мин, экстракт пентана удаляли, а затем погружали в дихлорметан на 5 мин. Объем экстрагирующего растворителя вычисляли исходя из площади насекомого. Среднюю поверхность рассчитывали по формуле: $2(lb + bh + hl)$, где *l*–высота тела, а *b* и *h*–стороны. Экстракты концентрировали под струей азота и наносили на покровные листы. Далее использовали чашки Петри с агаризированной средой, на которую наносили суспензию с конидиями (0,1 мл) и сушили на воздухе в течение 1–2 ч в ламинарном боксе для удаления избытка жидкости. Сразу же после испарения растворителя на листьях и после подсушивания агара в чашках Петри, листы помещали на агар. Чашки Петри запечатывали Парафильмом-М и инкубировали при температуре 25 °С. Затем покровные листы, к которым прилипли проросшие и непроросшие конидии, изымали, помещали на предметные стекла и окрашивали лактофеноловым синим (Fluka, Швейцария). Проросшие и непроросшие конидии, а также процент проросших конидий с аппрессориями подсчитывали под световым микроскопом в процентном соотношении. Прорастание конидий оценивали после 12 ч инкубации. Формирование аппрессорий оценивали после 42 ч культивирования. Подсчет и наблюдение производили при 100-кратном увеличении с использованием

иммерсионного масла. Контрольные чашки, содержащие среду и конидиальную суспензию, накрывали покровным стеклом, предварительно обработав соответствующим растворителем [17].

Таким образом, в отношении выбора методических подходов оценки энтомопатогенных микромицетов, авторы в первую очередь учитывали физиологические особенности насекомого, его стадию вредоносности. При изучении механизмов действия, исследователи вводили в тело насекомого инъекции с суспензией патогена. К дополнительным способам отбора можно отнести изучение прорастания и адгезии грибов на поверхности тела насекомого [16, 17].

Бактерии. На сегодняшний день наиболее изученными представителями энтомопатогенных бактерий являются рода *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Streptomyces* и *Saccharopolyspora*. У человека и животных они способны вызывать различные заболевания, которые могут сопровождаться сепсисом.

В сельскохозяйственной практике наиболее распространен биологический контроль фитофагов с применением биоинсектицидов на основе штаммов *B. thuringiensis*. В России повсеместно применяются, демонстрируя широкую эффективность (до 90 %), препараты «Битоксибациллин» (на основе *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* штамм 98) и «Лепидоцид» (на основе спорово-кристаллического комплекса *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Z-52) [4, 18]. В результате деятельности энтомопатогенных бактерий выявлено не только уменьшение общего количества вредителей, но и снижение плодовитости взрослых особей, а также отрождение неполноценных и/или фертильных насекомых [19].

Инфицирование энтомопатогенными бактериями почти всех членистоногих происходит перорально, что связано с механизмом действия этих микроорганизмов. Например, жидкие культуры, растворы спорово-кристаллических комплексов или токсинов бактерий смешивают в необходимой концентрации со свежеприготовленной ИПС и разливают агаризованную среду в луночные планшеты или чашки Петри. После застывания ИПС нарезают на кусочки массой 2,5 г на одну гусеницу и используют в качестве питательного субстрата [20–25]. В контрольных вариантах используют дистиллированную воду. Насекомых содержат как изолированно, так и группами по 10–30 шт. в зависимости от их размера и биологических особенностей [21, 22, 26].

В некоторых экспериментах авторы кормили насекомых инфицированной пищей в течение 24 ч, а затем заменяли ИПС на свежую [27]. Контрольные и экспериментальные варианты содержали в комфортных для личинок условиях, в зависимости от видовой принадлежности. Смертность регистрировали каждые 24 ч, или через 14, 18, 24 и 32 ч после обработки, учитывая агрессивность штаммов [22, 24, 28].

Группа исследователей из Индии производила инъекции гусеницам непарного шелкопряда, при этом отбирали крупных особей четвертого-шестого возраста. Иногда личинки анестезировали перед процедурой путем охлаждения на льду в течение 15 мин, затем поверхность гусеницы стерилизовали 95 %-м этанолом [28]. Далее вводили 10 мкл на одну гусеницу в основание последнего пролега (ложноножки) или в брюшную полость между первой и второй парой проножек, вводя иглу параллельно стенке тела во избежание повреждения пищеварительного канала. Использовали микроинъектор Буркарда с подкожным шприцем объемом 1 мл и иглами 0,45 × 12,0 мм (Terumo) или пипетку объемом 20 мкл, с обрезанным наконечником объемом 200 мкл иглой 27-го калибра. Учёт смертности проводили ежедневно в течение недели. Выделение гемолимфы для

дальнейшего анализа у зараженных гусениц производили через 8–24 ч после введения инъекций [28–31].

Альтернативным способом инфицирования чешуекрылых является метод погружения листьев растений или листовых дисков в жидкую культуру бактерий. Методика заключается в использовании конкретной площади листа для заражения, а именно поверхности диаметром 5–10 см. При инокуляции листья/диски погружают в ёмкость с суспензией от 10 с до 10 мин с последующей сушкой до полного испарения воды [32–35]. В своих работах с капустной молью *Plutella xylostella* L. авторы использовали похожий метод поверхностного инокулирования питательного субстрата. Таким образом, на лист/диск наносили по 2 мл суспензии и полностью просушивали [24, 35]. Насекомых содержали как изолированно, так и группами по 10–20 шт. Учет смертности проводили каждые 24 ч в течение недели или до окукливания [24, 33–35].

В работах Magalhães G. O. с соавторами наблюдали динамику поглощения оболочек листа капусты капустной молью. Для этого листья обрабатывали погружным методом в бактериальную суспензию, а затем наносили на поверхность 1 %-й фуксин и выдерживали в течение 12 ч [36]. После листья промывали водой, а количество питательных оболочек подсчитывали с помощью стереомикроскопа (Leica M 80, Leica Microsystems, Wetzlar, Германия). Обработанные листья капусты заменяли каждые два дня [35]. В ряде идентичных опытов с яблонной плодовой гусеницей, гусениц ограничивали в пище в течение 2 ч до начала экспериментального кормления для более активного поглощения питательного субстрата в ходе эксперимента [33, 26].

В большинстве исследований авторы наблюдали патогенное действие *B. thuringiensis* в отношении чешуекрылых, которое проявлялось у насекомых только после попадания токсина перорально, а органом-мишенью был кишечник. Основным симптомом токсичности являлось снижение кормовой активности с последующим параличом кишечника. В некоторых работах отмечена гибель гусениц на вторые–четвертые сутки. Различия в восприимчивости к *B. thuringiensis* зависели не только от взаимодействия «токсин–рецептор», но и от защитных иммунных механизмов хозяина [33, 37]. Кристаллы проникали в кишечные стенки при высоком рН в средней кишке, высвобождая δ -эндотоксины (прототоксины). Токсины активировались резидентной протеазой и связывались с рецепторными протеинами и образовывали поры на мембране, что приводило к гибели насекомых [33, 37]. В 2011 г. ученые установили, что бактериальные токсины взаимодействуют с кишечными белками чешуекрылых [23]. Они собирали кишечный сок после кормления, вызывая отрыжку у гусениц пятого возраста путем нанесения ударов электрическим током (20–30 В). Извергнутые кишечные соки собирали и готовили супернатант центрифугированием при 13000 об./мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Концентрацию экстракта кишечного сока определяли по методу Брэдфорда [38]. Очищенные прототоксины (20 мкг) смешивали с растворимыми белками в кишечном соке личинок (3 мкг) или с трипсином поджелудочной железы крупного рогатого скота (0,5 мкг) (Amersham Pharmacia Biotech, Франция) в конечном объеме 50 мкл с использованием натрий-фосфатного буфера. Смеси инкубировали при 37 °С и постоянном перемешивании в течение 2 ч. Затем протеолиз останавливали добавлением 0,1 ммоль фенилметилсульфонилфторида (PMSF) конечной концентрации. Образцы отделяли электрофорезом в 10 %-м полиакриламидном геле и окрашивали красителем Кумасси. Оценивали протеолитическую активацию токсина (качественный анализ) [23].

Abdelkefi-Mesrati L. с соавторами обнаружил, что прототоксины меняют клеточную структуру средней кишки [23]. Для этого кишечники (3–5 мг) отделяли от личинок последнего возраста, промывали в ледяном буфере, замораживали в жидком азоте и выдерживали при температуре -80°C до востребованности. Мембранные везикулы с щеточным краем (МВЦК) получали методом дифференциального осаждения магния [39]. Очищенные прототоксины активировали протеолизом с использованием трипсина поджелудочной железы крупного рогатого скота (Amersham Pharmacia Biotech, Франция) в соотношении трипсин:прототоксин 1:40 и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Активированные чистые токсины разводили в бикарбонатном буфере (40 ммоль) до конечной концентрации 1 мг/мл. Затем добавляли 40 мкл субстрата для биотинилирования (ECL™ proteinbiotinylationmodule: Amersham Pharmacia Biotech, Франция) и инкубировали смесь при комнатной температуре и постоянном перемешивании в течение 1 ч. Очистку биотинилированного токсина проводили путем элюирования смеси с использованием натрий-фосфатного буфера для доведения pH до 7,5. Далее токсин инкубировали с МВЦК в буфере в течение 1 ч при 28°C . Затем несвязанный токсин удаляли центрифугированием (14000 об./10 мин) и промывали тем же буфером. После МВЦК суспендировали в 20 мкл натрий-фосфатного буфера и электротрансферировали на нитроцеллюлозную мембрану. Биотинилированные белки, которые были связаны с МВЦК, были визуализированы с помощью люминола в соответствии с протоколом производителя (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Франция) [23].

Ху Х. Х. с соавторами изучал количество антибактериального белка гловрина [40]. Для определения индуцированной экспрессии MsGlv (гловрин *Manduca sexta*) двухдневным личинкам пятого возраста вводили внутривентриально водную суспензию убитых нагреванием бактерий *B. subtilis*. Через 24 ч после инъекции гемоциты, жировое тело и кишечник собирали отдельно и промывали три раза вантикоагулянтном буфере и получали из них белковые экстракты. Экспрессию белка MsGlv в этих тканях определяли методом Вестерн-блот-анализа с использованием поликлональной кроличьей антисыворотки против рекомбинантного pro-MsGlv [40].

Изучая энтомопатогенную активность бактериальных штаммов в отношении насекомых, большинство авторов преимущественно руководствуются подходами перорального заражения, при котором в ИПС или естественный источник питания вносят бактериальную суспензию. При этом насекомые питаются зараженным кормом до смерти или несколько часов, с последующей заменой рациона на незараженную [20–25, 32–35]. Из качественных методов оценки энтомопатогенного действия можно выделить исследование кишечника и кишечного эпителия на предмет патологий и деформаций, а также измерения уровня гловрина в организме инфицированных насекомых. В этих случаях авторы вводят в тело насекомого инъекции на основе штаммов [23, 33, 37, 40].

Вирусы. Энтомопатогенные вирусы, используемые в сельскохозяйственной практике в РФ, на данный момент представлены вирусом ядерного полиэдроза хлопковой совки («Хеликовекс», СК) и вирусом гранулёза яблонной плодовой гни [4]. Из особенностей вирусных штаммов можно выделить узкоспецифичность, высокую вирулентность и патогенность в отношении насекомого-вредителя. Отбор и наработку биомассы штамма вируса можно осуществить только на живых насекомых или культуре клеток [41, 42].

Для оценки энтомопатогенной активности вирусных штаммов в отношении лабораторных популяций насекомых-вредителей, таких как малая совка и яблонная плодовая гни, используют суспензию. Существует несколько способов получения

суспензии различной чистоты и концентрации. Одни исследователи в своих работах использовали способ, в котором зараженных гусениц (30 шт.) гомогенизировали в 10 мл стерильной воды и полученный гомогенат фильтровали через несколько слоёв марли, нейлона или через металлическую сетку с размером пор 80–500 мкм. Если суспензию получали слишком густой, её дополнительно разбавляли 15 мл воды [43–45]. Суспензию хранили в стеклянных банках объемом 600 мл при температуре 4 °С [43].

Другие авторы осуществляли измельчение гусениц в 0,01 % фосфатном буферном растворе (рН 7,0). Некоторые предварительно замораживали насекомых при –20 °С для более эффективного высвобождения вируса из клеток [46]. Полученную суспензию фильтровали четыре раза через четыре слоя марли. Фильтраты дважды центрифугировали при 900 об./15 мин, а затем дважды центрифугировали супернатант в течение 30 мин (10000 об./мин) для концентрации вирусных включений. Очищенные гранулы или полиэдры диспергировали в буфере и подвергали 50 %-му градиентному центрифугированию сахарозы. Полученный концентрат хранили при температуре 4 °С до использования [47].

В ряде работ вирусные тельца извлекали из мертвых гусениц путем гомогенизации трупов в 0,1–0,5 % растворе лаурилсульфата натрия и очищали фильтрацией через марлю или сетку и центрифугировали от 30 до 60 мин при 4000–40000 об. Процесс центрифугирования осуществляли на градиенте сахарозы или глицерина (30–60 %) при котором в центрифужную пробирку последовательно наливали сначала раствор с наибольшим процентом глицерина/сахарозы, затем раствор с меньшим процентом глицерина/сахарозы, а сверху – вирусный суспензионный образец [48]. После цикла центрифугирования видимую полосу в середине пробирки извлекали и при необходимости ресуспендировали в дистиллированной воде и/или повторяли цикл центрифугирования еще раз [42, 49–52]. Хранение осуществляли в холодильной камере при 4 °С или замораживали при –20 °С [42, 49, 51].

Большинство авторов в своих работах использовали способ заражения гусениц яблонной плодовой гусеницы, при котором насекомым скармливали инокулированную питательную среду. Исследователи, которые использовали для испытаний штаммов вирусов новорожденных особей или гусениц первого возраста инфицирование ИПС осуществляли путем вмешивания вирусной суспензии в среду на этапе приготовления. [46, 52–56]. ИПС помещали в 96-, 50-, 24-луночные лотки или индивидуально в чашки Петри, колбы или стаканы из расчета 1 г уже зараженной среды на одну гусеницу, либо ≈20 мкл среды и 0,06 мкл суспензии на одну гусеницу с использованием метода поверхностного заражения [45, 46, 52–55].

В своих исследованиях Yu H. с соавторами изучал энтомопатогенную активность штамма NPV *Helicoverpa armigera* на гусеницах второго–шестого возраста, заражение осуществляли в основном поверхностным методом, использовали насекомых, которые голодали перед началом экспериментальной работы в течение ночи [41]. Авторы в своих работах по оценке энтомопатогенной активности на одну гусеницу использовали 2–5 мм² или 1 мл среды, которую обрабатывали 3–50 мкл суспензии [44–46, 51, 55, 57]. Насекомых раскладывали индивидуально или по лункам, позволяли питаться зараженным кормом в течение 12–24 ч, а затем осуществляли замену рациона на безвирусный, либо оставляли на вирусосодержащей диете без замены вплоть до гибели [41, 43–46, 51, 55, 57–59]. Учет погибших особей проводили на 1, 7, 10, 14 и 21 сутки или ежедневно в течение одной–трех недель [44, 51, 54–57, 59].

В работах, где авторы использовали инъекции для инокуляции, отбирали гусениц третьего возраста и вводили им 0,06–2,00 мкл или 100–500 нг суспензии непосредственно в гемоцель путем прокола [41, 60]. Инъекцирование осуществляли с

помощью микроконтроллера Microsyringe Pump Controller (World Precision Instruments) под микроскопом (S730 Olympus, Токио, Япония). В качестве иглы был использован съемник микропипетки ПН-30 (Narishige, Япония, Токио), из которого сделали стеклянный капилляр необходимой длины и диаметра [60]. Зараженных гусениц яблонной плодовой гусеницы выращивали индивидуально в 24-луночных лотках для культивирования насекомых и ежедневно осматривали, пока все гусеницы не окукливались или не умирали [41].

Некоторые исследователи процесс инокуляции осуществляли с помощью метода капельного кормления. Для этого группе гусениц хлопковой совки четвертого-пятого возраста давали пить из капель вирусной суспензии, смешанной с раствором сахарозы, в течение 10-минутного периода. Капли создавали с помощью шприца, выдавливая небольшое количество смеси на стеклянную поверхность. После этого личинок немедленно перемещали к каплям. Особей, проглотивших суспензию, переносили в индивидуализированные пластиковые стаканы, содержащие блок полусинтетической диеты, и содержали до смерти или окукливания [57, 61, 62].

При заражении яиц томатной минирующей моли суспензию вирусных изолятов распыляли на вощеную бумагу, на которую предварительно производили откладку взрослые насекомые. После этого бумажные листы с яйцами помещали поверх чистых плодов или растений и инкубировали в пластиковых контейнерах при необходимой для того или иного вида температуре и влажности. Учет отродившихся личинок проводили через 25 дней [42].

В ряде работ по инокуляции гусениц малой совки особям 1-3 возраста скамливали обработанные разными способами листья растений. Заражение осуществляли как целого растения и затем срезали необходимое количество листьев, так и уже срезанных листьев по отдельности. Некоторые авторы использовали метод листового диска [32, 41]. При обработке использовали 1 мл/лист или 60 мл/растение вирусной суспензии с добавлением 0,2 % коммерческого влажного прилипателя на основе нонилфеноксиполиэтиленоксиэтанола (Agral®, Syngenta Agro, Мадрид, Испания) или без него [32, 57]. После обработки листа/растения вирусной суспензией с помощью небулайзера, пульверизатора или пипетки, их подсушивали на воздухе и распределяли по лоткам, пробиркам или контейнерам из расчета 1–4 гусеницы на лист. Насекомых распределяли группами или индивидуально в зависимости от физиологии вредителя и содержали в комфортных для них условиях. Ваугатоглу Z. с соавторами использовал в эксперименте гусениц американской белой бабочки, которые предварительно голодали в течение 5 ч [49]. После полного или частичного поглощения зараженной пищи насекомых снабжали свежими не инокулированными листьями или искусственным субстратом по необходимости. Учет погибших особей регистрировали каждый день, пока все гусеницы не умерли или не окуклились [32, 41, 49, 57].

В ряде исследований по изучению энтомопатогенной активности вирусных штаммов в качестве объекта инокуляции использовали клеточную культуру, которую получали из лабораторной популяции насекомых. Для этого культивирование осуществляли при оптимальной температуре и на специализированных средах. Например, культуру клеток хлопковой совки культивировали при 27 °С в среде TNM-FH Insect Medium (Sigma, StLouis, MO, USA) [41]. При этом в состав среды дополнительно добавляли 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) от общего объема. Заражение культуры осуществляли добавлением 1–2 мкг очищенной бакмидной ДНК вируса и последующей культивацией от 120 ч до 20 дней. По истечении времени часть культуры изымалась

для наблюдения цитопатического эффекта – возникновение дегенеративных изменений в клеточных культурах, связанное с размножением вирусов [41, 51]. Если при культивировании вносили флуоресцентномеченные вирусные бакмиды, наблюдали усиленную клеточную флуоресценцию [51].

В ходе работ по оценке энтомопатогенной активности у инфицированных насекомых отмечали образование меланизированных узелков после введения 0,5 мкл вирусной суспензии в гемоцель личинок третьего возраста с помощью инъектора и инкубации в течение 8 ч при 25 °С. Затем личинок рассекали на дорсальной стороне и подсчитывали меланизированные узелки на кишечнике и жировом теле под микроскопом (SZX 9, Olympus) при 50-кратном увеличении. После иссечения желудочно-кишечного тракта узелки в ранее не подвергавшихся воздействию областях и оставшиеся внутренние ткани так же подсчитывали и добавляли к первоначальному подсчету [60].

Некоторые авторы в своей работе дополнительно производили учет концентрации 20-гидроксиэкдизона в гемолимфе насекомых, гормона, отвечающего за стадии линьки, а также вырабатываемого в ответ на инфицирование насекомого. Для этого из зараженных насекомых отбирали 0,5–2,0 мл гемолимфы. Сначала каждую личинку стерилизовали 75 % спиртом и очищали дистиллированной водой. Затем разрезали кожный покров между третьим и четвертым брюшными сегментами, отбирали гемолимфу с помощью капиллярной трубки в ледяной антикоагуляционный буфер (98 ммоль NaOH; 0,19 моль NaCl; 1,7 моль ЭДТА; 41 моль лимонной кислоты, pH = 4,5). Образец, содержащий 50 мл гемолимфы (объединенный из 25–100 личинок), использовали для определения концентрации 20-гидроксиэкдизона. Каждый образец центрифугировали при температуре 4 °С и 800 об./мин в течение 10 мин для удаления гемоцитов и других остатков тканей, затем супернатант собирали и хранили при температуре –20 °С [63]. Титры гормона 20-гидроксиэкдизона определяли количественно с помощью радиоиммунного анализа по методу Vorst и O'Connor [58, 64].

В отношении энтомопатогенных вирусов исследователи руководствуются высокой специфичностью штаммов в отношении конкретного вида вредителя и особенностями проникновения в тело насекомого. Стоит отметить, что наиболее распространенным методом оценки действия энтомопатогенных вирусов в лабораторных условиях является метод поверхностного заражения источника питания тестируемого насекомого [46, 52–56]. Отличительная особенность вирусных объектов – размножение исключительно на живых насекомых или на культуре клеток насекомых-продуцентов [41, 43–46, 51, 55, 57–59]. К дополнительным критериям оценки энтомопатогенного действия энтомопатогенных вирусов относят наличие и количество меланизированных узелков внутри зараженного насекомого, а также измерение уровня концентрации 20-гидроксиэкдизона [58, 60].

Выводы

Поиск и систематизация актуальных методических подходов для оценки энтомопатогенных биологических агентов в зависимости от таксономической принадлежности является важной частью работы на этапе планирования эксперимента. В процессе исследований авторы модифицируют общепринятые методы и ведут поиск новых подходов.

Обобщение сведений из литературных источников показывает, что для оценки энтомопатогенной активности используют личинки/гусеницы лабораторных популяций целевых насекомых или типичных для отрядов тест-объектов.

При отборе наиболее активных штаммов энтомопатогенных грибов исследователи чаще всего использовали методы, которые предполагали непосредственный контакт лабораторных насекомых с суспензионной культурой путем погружения личинок в водный раствор на определенный промежуток времени с последующим их содержанием в условиях, приближенным к природным. При этом важным аспектом, необходимым для исследования энтомопатогенных свойств грибных изолятов, является его проникновение в полость тела через кутикулу.

При отборе перспективных бактериальных агентов в отношении личинок исследователи использовали метод перорального заражения с использованием ИПС. Особенностью энтомопатогенных бактерий является их способность образовывать токсины, которые при проглатывании насекомым с пищей вызывают резкую интоксикацию всего организма вплоть до гибели. Попадая внутрь с пищей, энтомопатогенные бактерии поражают в первую очередь кишечник, вызывая патологические изменения в клеточной структуре за счет действия прототоксинов.

Вирусы отличаются высокой избирательностью. Установлено, что инокуляция лабораторных популяций насекомых энтомопатогенными вирусами происходит чаще перорально, как в случае с использованием бактериальных штаммов, однако критерием отбора служит меланизация зараженных тканей и органов. Также из особенностей патологического процесса можно выделить разжижение трупa после гибели насекомого.

Исследования выполнены согласно Государственному заданию № 075-00376-19-00 Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме № 0686-2019-0013.

Литература / References

1. Avelino J., Allinne C., Cerda R., Willocquet L., Savary S. Multiple-disease system in coffee: from crop loss assessment to sustainable management // Annual Review of Phytopathology. 2018. No. 56(1). P. 611–635. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080417-050117.
2. Sharma S., Kooner R., Arora R. Insect pests and crop losses // In book: Breeding insect resistant crops for sustainable agriculture // Ed. by Arora R., Sandhu S. 2017. P. 45–66. DOI: 10.1007/978-981-10-6056-4_2.
3. Бондарчук Е. Ю., Асатурова А. М., Томашевич Н. С., Цыгичко А. А., Гырнец Е. А. Биологический контроль численности яблонной плодовой моли на основе энтомопатогенных микроорганизмов (обзор) // Достижения науки и техники АПК. 2020. № 11. С. 53–66. (Bondarchuk E. Y., Asaturova A. M., Tomashevich N. S., Tsygichko A. A., Gyrnets E. A. Biological control of the codling moth abundance based on entomopathogenic microorganisms (review) // Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex. 2020. No. 11. P. 53–66. DOI: 10.24411/0235-2451-2020-11108).
4. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Часть I. М.: МСХ РФ, 2021. С. 9–160. (State catalog of pesticides and agrochemicals approved for use on the territory of the Russian Federation. Part I. Moscow: Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 2021. P. 9–160).
5. Amatuzzi R. F., Cardoso N., Poltronieri A. S., Poitevin C. G., Dalzoto P., Zawadeneak M. A., Pimentel I. C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae) // Brazilian Journal of Biology. 2017. No. 78(3). P. 429–435. DOI: 10.1590/1519-6984.166681.
6. Renwick J., Daly P., Reeves E. P., Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination // Mycopathologia. 2006. No. 161(6). P. 377–384. DOI: 10.1007/s11046-006-0021-1.
7. Dubovskiy I. M., Whitten M. M. A., Kryukov V. Y., Yaroslavtseva O. N., Grizanova E. V., Greig C., Mukherjee K., Vilcinskas A., Mitkovets P. V., Glupov V. V., Butt T. M. More than a colour change: insect melanin, disease resistance and fecundity // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2013. No. 280 (20130584). DOI: 10.1098/rspb.2013.0584.
8. Asomiba R. A. Evaluation of entomopathogenic fungi (Ascomycota) for the control of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). The Masters of Technology degree. South Africa: Cape Peninsula University of Technology, 2014. 83 p.
9. Falchi G., Marche M. G., Mura M. E., Ruiu L. Hydrophobins from aerial conidia of *Beauveria bassiana* interfere with *Ceratitis capitata* oviposition behavior // Biological Control. 2015. No. 81. P. 37–43. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2014.11.005.

10. Akello J., Dubois T., Coyne D., Kyamanywa S. Effect of endophytic *Beauveria bassiana* populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and their damage in tissue-cultured banana plants // Entomologia Experimentalis et Applicata. 2008. No. 129(2). P. 157–165. DOI:10.1111/j.1570-7458.2008.00759.x.
11. Goettel M. S., Inglis G. D. Fungi: Hyphomycetes // In book: Manual of techniques in insect pathology // Ed. by Vega F. E., Kaya H. K. San Diego: Academic Press, 1997. P. 213–249.
12. Meyling N. Methods of isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Denmark: Organic Eprints, 2007. P. 18.
13. Hussein H. M., Zemek R., Habuštová S. O., Prenerová E., Adel M. M. Laboratory evaluation of a new strain CCM 8367 of *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.) // Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2013. No. 46(11). P. 1307–1319. DOI:10.1080/03235408.2013.765677.
14. Gürlek S., Sevim A., Sezgin F. M., Sevim E. Isolation and characterization of *Beauveria* and *Metarhizium* spp. from walnut fields and their pathogenicity against the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) // Egyptian Journal of Biological Pest Control. 2018. No. 28(1). DOI: 10.1186/s41938-018-0055-y.
15. Khosravi R., Sendi J. J., Zibae A., Shokrgozar M. A. Virulence of four *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Asc., Hypocreales) isolates on rose sawfly, *Argerosae* under laboratory condition // Journal of King Saud University – Science. 2015. No. 27(1). P. 49–53. DOI: 10.1016/j.jksus.2014.04.003.
16. Jarrold S. L., Moore D., Potter U., Charnley A. K. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle // Mycological Research. 2007. No. 111(2). P. 240–249. DOI: 10.1016/j.mycres.2006.10.007.
17. Ment D., Gindin G., Soroker V., Glazer I., Rot A., Samish M. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface // Journal of Invertebrate Pathology. 2010. No. 103(2). P. 132–139. DOI: 10.1016/j.jip.2009.12.010.
18. Франк Р. И., Кищенко В. И. Биопрепараты в современной земледелии // Защита и карантин растений. 2008. No. 4. С. 30–32. (Frank R. I., Kishchenko V. I. Biological products in modern agriculture // Zashchita i karantin rasteniy. 2008. No. 4. P. 30–32.)
19. Морозов Д. О., Коршунов С. А., Любобедская А. А., Мишуrow Н. П., Коноваленко Л. Ю. Современные системы интегрированной защиты сельскохозяйственных растений: научный аналитический обзор // Под ред.: Мехрадзе Л. Т., Сидорова В. И. М.: Росинформагротех, 2019. 92 с. (Morozov D. O., Korshunov S. A., Lyubovedskaya A. A., Mishurov N. P., Konovalenko L. Yu. Modern systems of integrated protection of agricultural plants: a scientific analytical review // Ed. by Mekhradze L. T., Sidorova V. I. Moscow: Rosinformagrotekh, 2019. 92 p.)
20. Boncheva R., Dukijandjiev S., Minkov I., de Maagd R. A., Naimov S. Activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against codling moth (*Cydia pomonella* L.) larvae // Journal of Invertebrate Pathology. 2006. No. 92(2). P. 96–99. DOI: 10.1016/j.jip.2006.01.004.
21. Ruiu L., Falchi G., Floris I., Marche M. G., Mura M. E., Satta A. Pathogenicity and characterization of a novel *Bacillus cereus sensu lato* isolate toxic to the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wied // Journal of Invertebrate Pathology. 2015. No. 126. P. 71–77. DOI: 10.1016/j.jip.2015.01.010.
22. Boukedi H., Sellami S., Ktari S., Belguith-Ben Hassan N., Sellami-Boudawara T., Tounsi S., Abdelkefi-Mesrati L. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain with a promising toxicity against Lepidopteran pests // European Journal of Soil Biology. 2013. No. 56. P. 56–64. DOI: 10.1016/j.mires.2016.02.004.
23. Abdelkefi-Mesrati L., Boukedi H., Dammak-Karray M., Sellami-Boudawara T., Jaoua S., Tounsi S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis* // Journal of Invertebrate Pathology. 2011. No. 106(2). P. 250–254. DOI: 10.1016/j.jip.2010.10.002.
24. Kemp K., Griffiths J., Campbell S., Lovell K. An exploration of the follow-up needs of patients with inflammatory bowel disease // Journal of Crohn's and Colitis. 2013. No. 7(9). Art. No. e386–e395. DOI: 10.1016/j.crohns.2013.03.001.
25. Dubovskiy I. M., Krukova N. A., Glupov V. V. Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis* // Journal of Invertebrate Pathology 2008. No. 98(3). P. 360–362. DOI: 10.1016/j.jip.2008.03.011.
26. Grizanova E. V., Dubovskiy I. M., Whitten M. M. A., Glupov V. V. Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis* // Journal of Invertebrate Pathology. 2014. No. 119. P. 40–46. DOI: 10.1016/j.jip.2014.04.003.
27. Ertürk Ö., Demirba Z. Studies on bacterial flora and biological control agent of *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) // African Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 5 (22). P. 2081–2085.
28. Broderick N. A., Raffa K. F., Handelsman J. Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis* // BMC Microbiology. 2010. No. 10(1). P. 129. DOI: 10.1186/1471-2180-10-129.

29. Agaisse H., Gominet M., Okstad O. A., Kolsto A.-B., Lereclus D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis* // Molecular Microbiology. 1999. No. 32(5). P. 1043–1053. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x.
30. Salamitou S., Ramisse F., Brehélin M., Bourguet D., Gilois N., Gominet M., Hernandez E., Lereclus D. The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects // Microbiology. 2000. No. 146. P. 2825–2832. DOI: 10.1099/00221287-146-11-2825.
31. Vogel H., Altincicek B., Glöckner G., Vilcinskis A. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella* // BMC Genomics. 2011. No. 12(1). DOI: 10.1186/1471-2164-12-308.
32. Wan N.-F., Jiang J.-X., Li B. Effect of host plants on the infectivity of nucleopolyhedrovirus to *Spodoptera exigua* larvae // Journal of Applied Entomology. 2016. No. 140(8). P. 636–644. DOI:10.1111/jen.12298.
33. Mohammad A. K. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* berliner against bihar hairy caterpillar, *Spilarctia obliqua* (Walker) (Lepidoptera: Arctiidae). Diss. ... Dr. Sc. (Zool.) India: Aligarh Muslim University. 2006. 197 p.
34. Bandyopadhyay S., Gotyal B. S., Satpathy S., Selvaraj K., Tripathi A. N., Ali N. Synergistic effect of *Azadirachtin* and *Bacillus thuringiensis* against bihar hairy caterpillar, *Spilarctia obliqua* walker // Biopesticides International. 2014. Vol. 10. No. 1. P. 71–76.
35. Magalhães G. O., Vacari A. M., Laurentis V. L., De Bortoli S. A., Polanczyk R. A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides and the predatory stink bug *Podisus nigrispinus* to control *Plutella xylostella* // Journal of Applied Entomology. 2014. No. 139(1-2). P. 123–133. DOI: 10.1111/jen.12180.
36. Dibelli W., De Bortoli S. A., Volpe H. X. L., Vacari A. M., Magalhaes G. O., Duarte R. T., Polanczyk R. A. Effect of *Bacillus thuringiensis* on the biological parameters and phytophagy of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) // Entomol. Gener. 2013. No. 34. P. 313–321. DOI: 10.1127/entom.gen/34/2013/313.
37. Khan M. A., Paul B., Ahmad W., Paul S., Aggarwal C., Khan Z., Akhtar M. S. Potential of *Bacillus thuringiensis* in the management of pernicious lepidopteran pests // In book: Plant, Soil and Microbes. 2016. P. 277-303. DOI: 10.1007/978-3-319-29573-2_13.
38. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. No. 72. P. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
39. Wolfersberger M., Luthy P., Maurer A., Parenti P., Sacchi P. V., Giordana B. Preparation of brush border membrane vesicles (BBMV) from larval lepidopteran midgut // Comp. Biochem. Physiol. 1987. No. 86. P. 301–308.
40. Xu X.-X., Zhong X., Yi H.-Y., Yu X.-Q. *Manduca sexta* gloverin binds microbial components and is active against bacteria and fungi // Developmental & Comparative Immunology. 2012. No. 38(2). P. 275–284. DOI: 10.1016/j.dci.2012.06.012.
41. Yu H., Zhou B., Meng J., Xu J., Liu T.-X., Wang D. Recombinant *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus with arthropod-specific neurotoxin gene RjAa17f from *Rhopalurus junceus* enhances the virulence against the host larvae // Insect Science. 2016. No. 24(3). P. 397–408. DOI: 10.1111/1744-7917.12289.
42. Gómez Valderrama J. A., Barrera G., López-Ferber M., Belaich M., Ghiringhelli P. D., Villamizar L. Potential of betabaculoviruses to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick) // Journal of Applied Entomology. 2017. No. 142(1-2). P. 67–77. DOI:10.1111/jen.12406.
43. Zamora-Avilés N., Martínez A. M., Pineda S., Bravo-Patiño A., Figueroa I., Lasa R. Cool-textured diets for use in baculovirus production // Biocontrol Science and Technology. 2017. No. 27(11). P. 1327–1338. DOI: 10.1080/09583157.2017.1397598.
44. Liao Z. H., Kuo T. C., Shih C. W., Tuan S. J., Kao Y. H., Huang R. N. Effect of juvenile hormone and pyriproxyfen treatments on the production of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus // Entomologia Experimentalis et Applicata. 2016. No. 161(2). P. 112–120. DOI:10.1111/eea.12499.
45. Berling M., Blachere-Lopez C., Soubabere O., Lery X., Bonhomme A., Sauphanor B., Lopez-Ferber M. *Cydia pomonella* granulovirus genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts // Applied and Environmental Microbiology. 2008. No. 75(4). P. 925–930. DOI:10.1128/aem.01998-08.
46. Graillot B., Berling M., Blachere-López C., Siegwart M., Besse S., López-Ferber M. Progressive adaptation of a CpGV isolate to codling moth populations resistant to CpGV-M // Viruses. 2014. No. 6(12). P. 5135–5144. DOI: 10.3390/v6125135.
47. Jiang J. X., Zeng A. P., Ji X. Y., Wan N. F., Chen X. Q. Combined effect of nucleopolyhedrovirus and *Microplitis pallidipes* for the control of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* // Pest Manag. Sci. 2011. No. 67. P. 705–713. DOI: 10.1002/ps.2111.
48. Opoku-Debrah J. K., Hill M. P., Knox C., Moore S. D. Overcrowding of false codling moth, *Thaumotobia leucotreta* (Meyrick) leads to the isolation of five new *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus

- (CrleGV-SA) isolates // Journal of Invertebrate Pathology. 2013. No. 112(3). P. 219–228. DOI: 10.1016/j.jip.2012.12.008.
49. Bayramoglu Z., Nalcacioglu R., Demirbag Z., Demir I. Characterization of a Betabaculovirus from the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury. (Lepidoptera: Erebidæ), in Turkey // Biocontrol Science and Technology. 2018. Vol. 28. No. 12. P. 1–13. DOI:10.1080/09583157.2018.1520197.
50. Strand M. R. *Microplitis demolitor* Polydnavirus Infects and expresses in specific morphotypes of *Pseudoplusia includens* haemocytes // Journal of General Virology. 1994. No. 75(11). P. 3007–3020. DOI: 10.1099/0022-1317-75-11-3007.
51. Gebhardt M. M., Eberle K. E., Radtke P., Jehle J. A. Baculovirus resistance in codling moth is virus isolate-dependent and the consequence of a mutation in viral gene pe38 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014. No. 111(44). P. 15711–15716. DOI:10.1073/pnas.1411089111.
52. Rezapana M. Screening *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) isolates via comparative bioassays // Iranian Journal of Virology. 2015. No. 9(3). P. 1–5. DOI:10.21859/isv.9.3.1.
53. Undorf-Spahn K., Fritsch E., Huber J., Kienzle J., Zebitz C. P. W., Jehle J. A. High stability and no fitness costs of the resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-M) // Journal of Invertebrate Pathology. 2012. No. 111(2). P. 136–142. DOI: 10.1016/j.jip.2012.07.005.
54. Fan J., Wennmann J., Jehle J. Partial loss of inheritable Type I resistance of codling moth to *Cydia pomonella* granulovirus // Viruses. 2019. No. 11(6). P. 570. DOI: 10.3390/v11060570.
55. Graillot B., Blachère-Lopez C., Besse S., Siegwart M., Lopez-Ferber M. Importance of the host phenotype on the preservation of the genetic diversity in codling moth granulovirus // Viruses. Special Issue “Insect Viruses and Pest Management”. 2019. No. 11 (7). P. 621. DOI: 10.3390/v11070621.
56. Sauer A. J., Schulze-Bopp S., Fritsch E., Undorf-Spahn K., Jehle J. A. A third type of resistance to *Cydia pomonella* granulovirus in codling moths shows a mixed Z-linked and autosomal inheritance pattern // Applied and Environmental Microbiology. 2017. No. 83(17). DOI: 10.1128/aem.01036-17.
57. Arrizubieta M., Simón O., Torres-Vila L. M., Figueiredo E., Mendiola J., Mexia A., Caballero P., Williams T. Insecticidal efficacy and persistence of a co-occluded binary mixture of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV) variants in protected and field-grown tomato crops on the Iberian Peninsula // Pest Management Science. 2015. No. 72(4). P. 660–670. DOI:10.1002/ps.4035.
58. Ji X.-Y., Wan N.-F., Liu J., Jiang J.-X. Nucleopolyhedrovirus infection and/or parasitism by *Microplitis pallidipes* affected haemolymph titre of 20-hydroxyecdysone in *Spodoptera exigua* larvae // Journal of Applied Entomology. 2015. No. 140(1-2). P. 142–149. DOI:10.1111/jen.12230.
59. Sauer A. J., Fritsch E., Undorf-Spahn K., Nguyen P., Marec F., Heckel D. G., Jehle J. A. Novel resistance to *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) in codling moth shows autosomal and dominant inheritance and confers cross-resistance to different CpGV genome groups // PLOS ONE. 2017. No. 12(6). Art. No. e0179157. DOI: 10.1371/journal.pone.0179157.
60. Kim Y., Hapat R. Baculoviral p94 homologs encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppress both immunity and development of the diamondback moth, *Plutellae xylostella* // Insect Science. 2015. No. 23(2). P. 235–244. DOI:10.1111/1744-7917.12237.
61. Hughes P. R., Wood H. A. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses // J Invertebr Pathol. 1981. No. 37. P. 154–159. DOI: 10.1016/0022-2011(81)90069-0.
62. Virto C., Navarro D., Tellez M. M., Murillo R., Williams T., Caballero P. Chemical and biological stress factors on the activation of nucleopolyhedrovirus infections in covertly infected *Spodoptera exigua* // Journal of Applied Entomology. 2016. No. 141(5). P. 384–392. DOI: 10.1111/jen.12349.
63. Cônsoli F. L., Brandt S. L., Coudron T. A., Vinson S. B. Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps*–*Heliothis virescens* // Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2005. No. 142(2). P. 181–191. DOI: 10.1016/j.cbpc.2005.07.002.
64. Borst D. W., O'Connor J. D. Trace analysis of ecdysones by gas-liquid chromatography, radioimmunoassay and bioassay // Steroids. 1974. No. 24(5). P. 637–656. DOI: 10.1016/0039-128x(74)90017-8.

UDC 632.937

Bondarchuk E. Yu., Tsygichko A. A., Asaturova A. M.

METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF THE ENTOMOPATHOGENIC ACTIVITY OF MICROORGANISMS AGAINST INSECT PESTS *IN VITRO* (REVIEW)

Summary. Excessive application of chemical insecticides in agriculture has led to some serious problems that threaten the environment and human health. One of the possible ways to overcome the situation is to shift to environmentally-friendly

preparations based on entomopathogenic bioagents. The purpose of this review was to search for and systematize methodological approaches to determine the entomopathogenic activity of microorganisms of various taxonomic groups in laboratory conditions. The expediency of choosing the necessary method when studying a particular phenomenon or process is an important point both in the fundamental and applied field of research. The primary assessment of the entomopathogenic activity of microorganisms in vitro is the basis for expanding the spectrum of their action, introducing new strains into collections. It also contributes to the replenishment of knowledge about the already known properties of various types of microorganisms. All this, certainly, is connected with the further choice of them as biological agents. Each of the presented groups of entomopathogens has its distinctive features of the mechanisms of action determined by the target insect. Concerning the choice of methodological approaches for assessing the entomopathogenic effect of fungi, the authors relied on the physiological characteristics of the insect and its stage of harmfulness. The researchers were guided by methodological approaches of oral infection of insects using an infected food source to study the activity of bacterial strains. Pathological changes in the cellular structure, as well as deformations of intestinal elements, were noted. The most common way to assess the effect of entomopathogenic viruses in the laboratory is the method of surface infection of the food source of the tested insect, taking into account the high specialization of the agent. When studying the mechanisms of action of fungal, bacterial and viral agents, researchers injected a suspension of the pathogen into the insect's body. The search and systematization of relevant methodological approaches to assess entomopathogenic microorganisms depending on the taxonomic affiliation is an important part of the work directly related to the development of a high-quality and effective bioinsecticide.

Keywords: *methodological approaches, entomopathogenic microorganisms, entomopathogenic effects, bacteria, fungi, viruses.*

Бондарчук Елена Юрьевна, младший научных сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»; 350039, Россия, г. Краснодар, ФНЦБЗР, п/о 39; e-mail: alena_fox95@mail.ru.

Цыгичко Александра Александровна, младший научных сотрудник лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»; 350039, Россия, г. Краснодар, ФНЦБЗР, п/о 39; e-mail: 23612361@inbox.ru.

Асатурова Анжела Михайловна, кандидат биологических наук, директор ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»; 350039, Россия, г. Краснодар, ФНЦБЗР, п/о 39; e-mail: biocontrol-vniibzr@yandex.ru.

Bondarchuk Elena Yurievna, junior researcher of the Laboratory for the development of microbiological plant protection agents and formation of microorganisms, FSBSI "Federal Research Center of Biological Plant Protection"; Federal Research Center of Biological Plant Protection (FNCBZR) (post office No. 39), Krasnodar, 350039, Russia; e-mail: alena_fox95@mail.ru.

Tsygichko Aleksandra Aleksandrovna, junior researcher of the Laboratory for the development of microbiological plant protection agents and formation of microorganisms, FSBSI "Federal Research Center of Biological Plant Protection"; Federal Research Center of Biological Plant Protection (FNCBZR) (post office No. 39), Krasnodar, 350039, Russia; e-mail: 23612361@inbox.ru.

Asaturova Anzhela Mikhailovna, Cand. Sc. (Biol.), Director of FSBSI "Federal Research Center of Biological Plant Protection"; Federal Research Center of Biological Plant Protection (FNCBZR) (post office No. 39), Krasnodar, 350039, Russia; e-mail: biocontrol-vniibzr@yandex.ru.

Дата поступления в редакцию – 31.05.2021.

Дата принятия к печати – 05.07.2021.