

УДК 57.055

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ЭНТОМОПАРАЗИТИЧЕСКОГО АСКОМИЦЕТА
BEAUVERIA BASSIANA
ПРИ ПАССИРОВАНИИ ЧЕРЕЗ РАЗНЫХ ХОЗЯЕВ**

© В. Ю. Крюков,¹ У. Н. Роцкая,¹ О. Н. Ярославцева,¹
Е. А. Елисафенко,² Б. А. Дуйсембеков,³ В. В. Глушов¹

¹ Институт систематики и экологии животных СО РАН,
ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091

² Институт цитологии и генетики СО РАН,
пр. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090

³ Казахский НИИ защиты и карантина растений,
ул. Казыбек би, 1, Алматы, Казахстан, 050012 (A25X0K9)

E-mail: krukoff@mail.ru

Поступила 01.06.2016

Проведены шестикратные пассажи энтомопаразитического аскомицета *Beauveria bassiana* (штамм Sar-31) через различных хозяев (*Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Locusta migratoria*) с последующей оценкой фенотипических и генетических различий исходного штамма и реизолятов. 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 6 межмикросателлитных (ISSR) маркеров, показал различия между исходной и селектированными культурами по 3 праймерам. Полученные результаты вносят вклад в понимание физиологических и генетических изменений патогенов в ходе эпизоотий и возможности использования метода ISSR для изучения трансмиссии паразитических грибов.

Ключевые слова: энтомопатогены, аскомицеты, пассажи, эпизоотии, ISSR, изменчивость.

Фенотипические и генетические свойства паразитов изменяются в ходе эпизоотийного процесса (Беляков и др., 1987). В частности, факультативные паразиты могут значительно изменять уровень вирулентности при постоянных пассажах через хозяев (Butt et al., 2006; Masri et al., 2015). Удобными объектами для моделирования данных процессов служат энтомопаразитические грибы в связи с относительно короткими жизненными

циклами хозяев, самих патогенов, а также удобностью культивирования обоих членов паразитарных систем. Аскомицет *Beauveria bassiana* sensu lato — эндофитный и энтомопатогенный гриб, имеющий широкий диапазон хозяев и использующийся для регуляции численности растительноядных и кровососущих насекомых (Zimmermann, 2007; Lacey et al., 2015). В природе гриб циркулирует в многовидовых сообществах наземных насекомых, вызывая периодические эпизоотии (Борисов и др., 2001; Augustyniuk-Kram, Kram, 2012). В межэпизоотийные периоды гриб способен длительно сохраняться в почве и развиваться во внутренних тканях растений (Vega et al., 2009; Varelli et al., 2016). Длительность эпизоотий, вызываемых энтомопатогенными аскомицетами, обычно составляет 1—3 года (Kamata, 2000; Борисов и др., 2001; Kryukov et al., 2011). За это время гриб проходит несколько пассажей через хозяев. Количество данных пассажей может зависеть от вольтичности хозяев, особенностей их фенологии, плотности популяций.

Многими авторами показано, что при пассажах грибов через хозяев происходит усиление их вирулентности (Butt et al., 2006). Кроме того, известно, что данные пассажи, как и культивирование штаммов на разных питательных средах, приводят к изменению ряда морфолого-физиологических свойств грибов: продуктивности конидий, скорости роста, активности ферментов, связанных с гидролизом кутикулы и др. (Cooper, Sweeney 1982; Vandenberg, Cantone, 2004; Shah et al., 2005; Scully, Bidochka, 2006; Safavi et al., 2007; Ansari, Butt, 2011). Однако механизмы этих изменений изучены слабо. Кроме того, исследования, при которых проводились пассажи грибов через разные виды хозяев с последующей оценкой генотипической и фенотипической изменчивости полученных клонов, единичны (Vandenberg, Cantone, 2004). Между тем подобные работы имеют не только теоретическое, но и прикладное значение для отслеживания «судьбы» штаммов, вносимых в биоценозы для создания искусственных эпизоотий, а также для оценки их влияния на нецелевую фауну.

Для выявления внутривидового полиморфизма аскомицетов и картирования различных изолятов широко используется метод анализа полиморфизма межмикросателлитных последовательностей в геноме с использованием ISSR праймеров (Estrada et al., 2007; Liang et al., 2008; Gramaje et al., 2014). Преимуществами данного метода являются хорошая воспроизводимость и высокий уровень выявляемого полиморфизма. Микросателлиты гипервариабельны и распределены по всему геному. Мутации в регионах микросателлитной ДНК образуются преимущественно по двум механизмам: 1) мутагенеза, обусловленного проскальзыванием ДНК-полимеразы вдоль цепи ДНК во время репликации, при котором происходит изменение последовательности на одну единицу повтора, 2) точечных замен. Показано, что скорость накопления мутаций прямо коррелирует с длиной микросателлитных аллелей (Dettman et al., 2004). Некоторые авторы (Gauthier et al., 2007) утверждают, что скорость мутагенеза в микросателлитных регионах у грибов выше, чем в остальной ДНК грибов, тогда как другие авторы (Demers et al., 2016) указывают, что она сравнима. В данной работе мы пытались выяснить, будут ли наблюдаться изменения ISSR профилей в ходе нескольких пассажей (приблизительно соответствующих эпизоотийному циклу) через разных насекомых-хозяев. Мы использовали

ISSR маркеры, выявляющие высокий уровень полиморфизма у природных изолятов *B. bassiana*, в том числе близких по морфологии, вирулентности и географическому происхождению (Estrada et al., 2007; Kgyukov et al., 2012).

Цель настоящей работы — исследовать фенотипические и генотипические изменения штамма *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. при непрерывном пассировании через разные виды насекомых; оценить возможность применения методики ISSR для типирования грибных штаммов при этих пассажах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Тест-насекомые и грибы

В работе использовали личинок природных популяций азиатской саранчи *Locusta migratoria* L., колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say, а также лабораторных популяций мучного хрущака *Tenebrio molitor* L. и вошинной огневки *Galleria mellonella* L. Был использован штамм Sar-31 *B. bassiana* s. s., выделенный из кубышек итальянского пруса *Calliptamus italicus* L. в степной зоне Западной Сибири в 2001 г. Культура поддерживалась на средах Чапека и Ваксмана при +4 °C и пересеивалась 1 раз в год.

Пассирование грибов через насекомых

В связи с различиями в чувствительности тест-насекомых к патогену их заражали разными методами и дозами. Личинок азиатской саранчи и колорадского жука инфицировали путем окунания на 10 с в водную (с добавлением Твин-20, 0.03 %) суспензию грибов с концентрацией 1×10^7 конидий/мл. В контроле личинок азиатской саранчи и колорадского жука обрабатывали водой с Твином-20. Личинок вошинной огневки и мучного хрущака инфицировали методом опыливания сухими конидиями гриба в 90 мм чашках Петри, при этом использовали навески высушенной грибной биомассы, содержащие 1×10^9 конидий в каждой навеске.

Личинок колорадского жука и азиатской саранчи содержали в вентилируемых контейнерах объемом 350 и 1000 мл соответственно. Личинок вошинной огневки и мучного хрущака содержали в 90 мм чашках Петри. Эксперименты проводили при 27—28 °C и 90—99 % RH. Учеты смертности проводили в течение 10 сут. Эксперименты ставили не менее чем в 3 повторностях. Каждая повторность включала не менее 10 особей. Погибших насекомых раскладывали в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу с целью получения следующей генерации конидий. Трупы с грибным спороношением хранили при +4 °C и использовали для последующих заражений. Всего проведено 6 непрерывных пассажей гриба через тестируемых насекомых. Уровень смертности варьировал в пределах 45—65 % в каждом раунде селекции. После 6-го пассажа была проведена перекрестная оценка вирулентности полученных реизолятов и исходной

культуры по методике, описанной выше. Кроме того, проводилось исследование их морфолого-культуральных свойств и изменений в микросателлитной ДНК.

Оценка морфолого-культуральных свойств изолятов

Для определения продуктивности конидий грибных культур из зоны роста колоний на среде Ваксмана вырезали блоки площадью 1 см², суспендировали в водно-твинном (0.05 %) растворе при 3000 об/мин в течение 1 мин и проводили подсчет конидий в гемоцитометре. Продуктивность спороношения на трупах насекомых определяли путем смыва конидий водно-твинным (0.05 %) раствором при 3000 об/мин в течение 3 мин с последующим подсчетом конидий в гемоцитометре. Для определения липазной активности штаммов использовали среду следующего состава (г/л): NaCl — 5, пептон — 15, дрожжевой экстракт — 5, Твин-20 — 10, агар-агар — 15. Измерение колоний и зон липолиза проводили через 4 сут после посева. Ферментативную активность выражали отношением диаметра зон вокруг колоний к диаметру самих колоний.

Анализ генетических различий

Для выделения ДНК мицелий штаммов культивировали на жидкой среде Чапека с пептоном (0.4 %) в шейкере при 130 об/мин и 27 °С в течение 6—7 сут. Мицелий осаждали при 10 000 g 10 мин, разрушали жидким азотом и затем выделяли суммарную ДНК при помощи набора DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) согласно протоколу производителя. Для анализа генетических различий были использованы межмикросателлитные (ISSR) праймеры, предложенные М. Эстрада с соавт. (Estrada et al., 2007): 809 — (AG)₈G; 818 — (CA)₈G; 842 — (GA)₈YG; 885 — BNB(GA)₇; 889 — DBD(AC)₇; 891 — HVH(GT)₇, где B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; V = A, C, G; Y = C, T (по номенклатуре IUPAC). Реакцию проводили в 50 мкл раствора, содержащего 10 мМ KCl, 20 мМ Tris-HCl pH 8.8, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого из четырех dNTP, 10 пмоль праймера, 0.1—0.5 мкг ДНК-матрицы и 5 ед. Taq-полимеразы. Амплификация образцов была выполнена на амплификаторе БИС-110. Условия ПЦР реакции: 1 шаг: денатурация — 94 °С, 5 мин; 2 шаг: денатурация — 94 °С, 30 с, отжиг — 52 °С, 45 с, элонгация — 72 °С, 2 мин, 45 циклов; 3 шаг: элонгация — 72 °С, 6 мин. Анализ полученных ПЦР-фрагментов ДНК проводили в 2%-ном агарозном геле, приготовленном на буфере TAE (40 мМ Tris-HCl pH 8.0, 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия (0.01 мкг/мл). В гель вносили образцы, содержащие 0.3—0.5 мкг ДНК, с добавлением 0.1 объема буфера, содержащего 50 % глицерина, 0.2 % ксиленианола и 0.2 % бромфенолового синего. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 5—10 В/см.

Статистический анализ

Данные проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Тьюки (STATISTICA, 8). При этом процентные значения были трансформированы в $\arcsin \%$. Данные на графиках представлены в виде средних арифметических и ошибок средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменения морфолого-культуральных свойств

После шести непрерывных пассажей штамма Sar-31 через *L. migratoria*, *L. decemlineata*, *T. molitor* и *G. mellonella* был выявлен ряд общих закономерностей в фенотипической изменчивости полученных культур. У всех

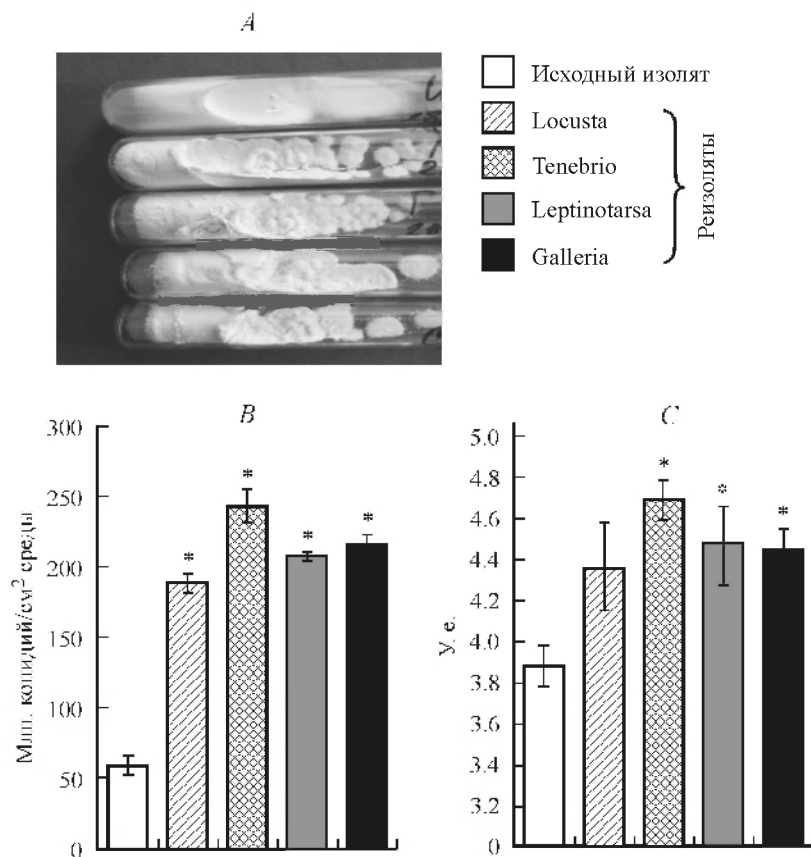


Рис. 1. Морфолого-культуральные свойства штаммов *Beauveria bassiana* Sar-31: исходного и пассированных через насекомых.

А — рост колоний на скошенном агаре (среда Ваксмана); В — продуктивность конидий на среде Ваксмана; С — липолитическая активность. * — $P < 0.05$ по сравнению с исходным штаммом.

Fig. 1. Morpho-cultural characteristics of the initial strain (*Beauveria bassiana* Sar-31) and its reisolates.

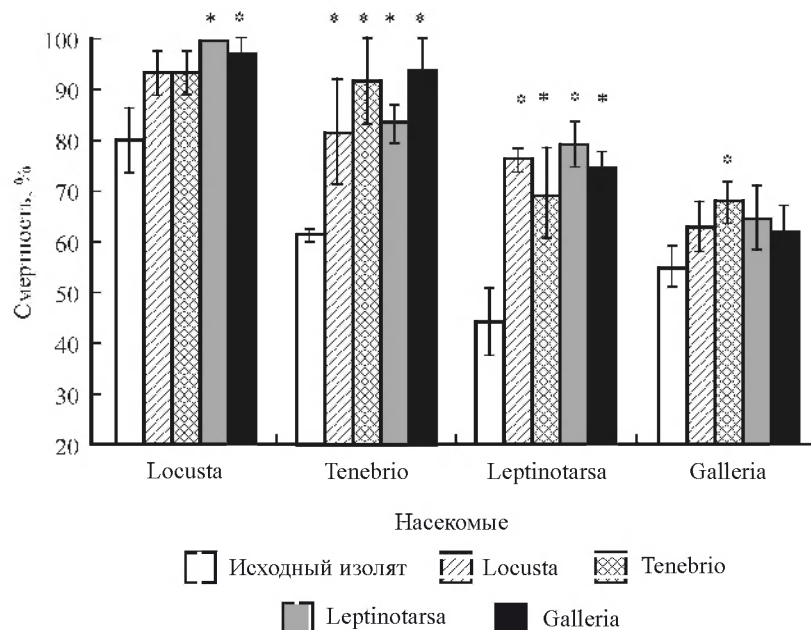


Рис. 2. Вирулентные свойства штаммов *Beauveria bassiana* Sar-31: исходного и пассированных через насекомых (смертность насекомых через 10 сут после заражения).

Обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. Virulence of the initial strain *Beauveria bassiana* Sar-31 and its reisolates (insect's mortality at 10 days after infection).

реизолятов отмечено появление отчетливого желтого пигмента и усиление рельефности колоний по сравнению с исходным штаммом (рис. 1, A). Кроме того, для всех реизолятов было характерно повышение липазной активности и продуктивности конидий на ИПС по сравнению с исходной культурой ($F_{4,15} = 4.0$, $p = 0.023$ и $F_{4,10} = 85.6$, $p < 0.00001$ соответственно) (рис. 1, B, C).

Изменения уровня вирулентности и продуктивности на трупах

Оценка вирулентности реизолятов к испытуемым насекомым показала повышение вирулентности ко всем хозяевам по сравнению с исходной культурой ($F_{4,80} = 4.3$, $p = 0.003$) (рис. 2). При этом вирулентность увеличивалась не только по отношению к тому тест-объекту, через которого проводились пассажи, но и ко всем остальным насекомым. Так, для мучного хрущака все исследуемые реизоляты были более вирулентными по сравнению с исходной культурой ($F_{4,10} = 4.0$, $p = 0.035$), но при этом между реизолятами, полученными от разных видов насекомых, существенных различий не отмечено (HSD Tukey: $P < 0.37$). Аналогичная закономерность выявлена для колорадского жука — все реизоляты были активнее исходного штамма ($F_{4,15} = 6.3$, $p = 0.003$), а различия между самими реизолятами были недостоверными (HSD Tukey: $P < 0.80$). Для азиатской саранчи и вошин-

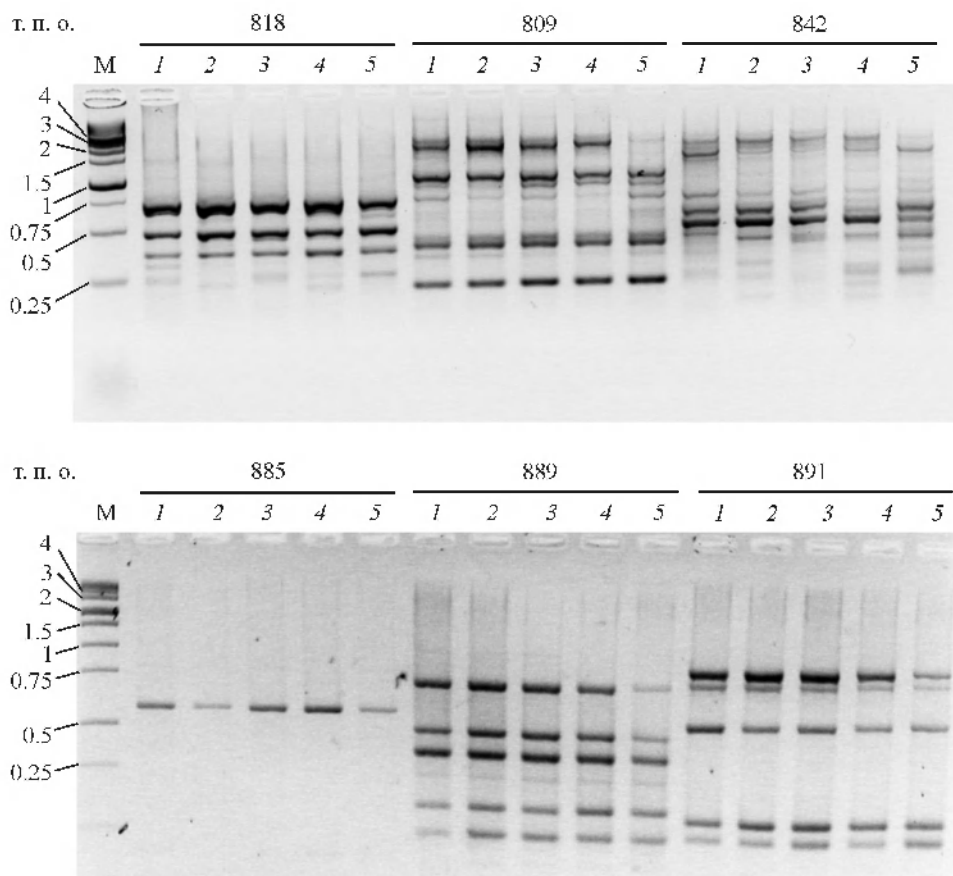


Рис. 3. Электрофореграммы по 6 ISSR праймерам исходного и пассированных штаммов *Beauveria bassiana* Sar-31.

1 — исходный штамм, 2 — пассированный через *Leptinotarsa*, 3 — через *Galleria*, 4 — через *Locusta*, 5 — через *Tenebrio*.

Fig. 3. Electrophoregrams of 6 ISSR markers of the initial strain *Beauveria bassiana* Sar-31 and its reisolates.

ной огневки также отмечена повышенная вирулентность реизолятов по сравнению с исходным штаммом, но преимущественно на уровне тенденций ($F_{4,25} = 2.3$, $p = 0.08$ и $F_{4,15} = 1.1$, $p = 0.38$ соответственно), а также отсутствие достоверных различий в вирулентности самих реизолятов (HSD Tukey: $P > 0.53$) (рис. 2).

Продуктивность конидиеобразования на трупах насекомых достоверно не изменялась, но отмечена тенденция к ее повышению у реизолятов по сравнению с исходным штаммом. В частности, на азиатской саранче продуктивность исходного штамма составила $4 \pm 2 \times 10^7$ конидий/особь, а реизолятов — в среднем $9 \pm 2 \times 10^7$ конидий/особь ($F_{4,5} = 1.6$, $p = 0.30$, HSD Tukey: $P > 0.25$).

Генетические изменения

Маркеры 885, 889, 891 не показали различий между исходной и селективными культурами (рис. 3). Анализ фингерпринтов, полученных с использованием 818, 809 и 842 праймеров, показал различия в ISSR профилях. Это проявилось в появлении ряда дополнительных минорных и мажорных полос или их исчезновении по сравнению с исходной культурой. В частности, маркеры 818 и 842 показали, что все полученные культуры генетически не идентичны. Наиболее выраженные отличия отмечены при пассировании штамма через мучного хрущака (образец 5). У данного реизолата отличия выявлены по трем маркерам (818, 809 и 842) (рис. 3), что может свидетельствовать о произошедших генетических изменениях микросателлитной ДНК.

ОБСУЖДЕНИЕ

При шестикратном пассировании штамма *B. bassiana* через разных хозяев наблюдались однонаправленные изменения фенотипических свойств реизолатов, связанные с усилением рельефности, повышением продуктивности, липолитической активности и вирулентности. Следует отметить, что ранее при исследовании изменчивости природных изолятов также были выявлены достоверные корреляции между вирулентностью, рельефностью колоний, продуктивностью и липолитической активностью (Круиков et al., 2010). Проведенные шестикратные пассажи могут соответствовать 2—3 летней эпизоотии гриба в популяциях насекомых. Ряд авторов (Борисов и др., 2001) предполагают, что при реализации эпизоотий у грибов при непрерывных пассажах, наряду с возрастанием вирулентности, происходит снижение продуктивности и жизнеспособности, что может быть обусловлено скоординированными изменениями признаков в процессе микроэволюции. Однако такое снижение может быть связано не с селекцией через хозяев как таковой, а с накоплением в естественных условиях сверхпаразитов, о чем также упоминает автор (Борисов и др., 2001).

Важно отметить, что селекция исходного изолята через разных хозяев не привела к формированию каких-либо специфических признаков. Пассажи гриба через определенного хозяина приводили к усилению вирулентности не только к целевому объекту, но и к насекомым других систематических групп. Это согласуется с исследованиями ряда авторов (Rehner, Buckley, 2005; Wang et al., 2005; Meyling et al., 2009), которые при исследовании филогении *B. bassiana* s.l. на основе различных молекулярных маркеров не нашли никаких доказательств приуроченности филумов грибов к определенным таксонам хозяев, но показали, что определенную роль во внутривидовой дифференциации играют географические факторы. Кроме того, ряд авторов (Bidochka et al., 2002; Wuyebek, Bidochka, 2013) показал, что в дифференциации популяций низко-специализированных аскомицетов из родов *Beauveria*, *Metarhizium* определяющую роль играют не столько насекомые—хозяева, сколько абиотические факторы и растения, колонизируемые данными грибами.

Возможно, возникшие в ходе селекции морфофизиологические преобразования штаммов являются результатом изменения экспрессии генов. Так, ряд исследователей (Shah et al., 2005; Safavi et al., 2007) показал изменение экспрессии генов, кодирующих сериновые протеазы (Pr1) у грибов *Beauveria* и *Metarhizium* при пассажах через насекомых и при разных способах культивирования *in vitro*. Полученные нами результаты показывают генетическую неоднородность по трем маркерам у исходного и селекционированных штаммов. Не исключено, что при многочисленных раундах репликации в микросателлитных локусах наблюдается возникновение мутаций, вследствие чего появляются полиморфные участки. При этом если микросателлитные тракты находятся в регуляторных районах генов, они могут оказывать влияние на их экспрессию (Hammock, Young, 2005; Michael et al., 2007).

Шесть раундов селекции были достаточными для накопления определенных изменений в ISSR профилях. При этом маркеры, показавшие отличия у реизолятов (818, 809 и 842), также выявляют наибольшее количество различающихся генотипов (до 100 %) в природных популяциях; однако маркеры, не выявившие какого-либо полиморфизма при пассажах (885, 889 и 891), также выявляют до 95 % разных генотипов среди природных изолятов *B. bassiana* (Estrada et al., 2007; Kryukov et al., 2012; Крюков и др., неопубликованные данные). Так или иначе уровень полиморфизма, возникающий при 6-кратном пассировании штамма резко ограничен по сравнению с полиморфизмом, наблюдаемым в природных выборках. Поэтому в ходе селекции вполне возможно отличить характерный фингерпринт штамма. Однако для надежной детекции определенной культуры целесообразно использовать несколько праймеров.

Наши исследования частично согласуются с работами Дж. Д. Вандерберг и Ф. А. Кантон (Vandenberg, Cantone, 2004), которые проводили 30-кратные пассажи штаммов *Isaria fumosorosea* Wize через тлей *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) и чешуекрылых *Plutella xylostella* L. При наблюдаемых фенотипических изменениях штаммов, происходящих при пассажах, авторы не обнаружили различий между исходными и пассированными культурами по фингерпринтам, полученным на основе использования 14 RAPD праймеров, что также свидетельствует о высокой фенотипической лабильности и относительной генетической стабильности энтомопаразитических грибов при пассажах.

Следует отметить, что проведенные исследования касаются исключительно лабораторных испытаний. При реализации эпизоотий в природных условиях помимо селекции, связанной с прохождением цикла грибов через хозяина, будет действовать целый ряд элиминирующих факторов, связанных с пребыванием конидий грибов во внешней среде, в частности с температурой, влажностью и солнечной радиацией. Воздействие данных факторов может приводить к более значительным фенотипическим и генетическим перестройкам. Поэтому следующим этапом в оценке трансформаций штаммов грибов при эпизоотиях, а также возможности использования генетических маркеров для детекции патогенов должны стать полевые исследования. Кроме того, весьма перспективным будет подход, основанный на анализе изменений обоих звеньев паразитарной системы в ходе последовательных раундов коэволюции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем признательность доктору биологических наук Закиану Су-рену Миначовичу (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия) за помощь в организации экспериментальной работы. Работа под-держана грантом РФФИ № 16-14-10067.

Список литературы

- Беляков В. Д., Голубев Д. Б., Каминский Г. Д., Тец В. В. 1987. Саморегуляция паразитарных систем: (молекулярно-генетические механизмы). Л.: Медицина. 240 с.
- Борисов Б. А., Серебров В. В., Новикова И. И., Бойкова И. В. 2009. Энтомопатогенные аскомицеты и дейтеромицеты. В кн.: Глухов В. В. (ред.). Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год. 352—427.
- Ansari M. A., Butt T. M. 2011. Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 110 : 1460—1469.
- Augustyniuk-Kram A., Kram K. J. 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests. In: Blanco J. A. (eds). *Forest ecosystems — more than just trees*. Rijeka, Shanghai. 265—294.
- Barelli L., Moonjely S., Behie S. W., Bidochka M. J. 2016. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Molecular Biology*. 90 (6) : 657—664.
- Bidochka M. J., Menzies F. V., Kamp A. M. 2002. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Archives of Microbiology*. 178 (6) : 531—537.
- Butt T. M., Wang Ch., Shah F. A., Hall R. 2006. Degeneration of entomogenous fungi. In: Eilenberg J., Hokkanen H. M. T. (eds). *An ecological and societal approach to biological control*. Springer Netherlands. Netherland, Springer. 2 : 213—226.
- Cooper R., Sweeney A. W. 1982. The comparative activity of the Australian and United States strains of *Culicinomyces clavosporus* bioassayed in mosquito larvae of three different genera. *Journal of Invertebrate Pathology*. 40 (3) : 383—387.
- Demers J. E., Jiménez-Gasco M. del M. 2016. Evolution of nine microsatellite loci in the fungus *Fusarium oxysporum*. *Journal of Molecular Evolution*. 82 (1) : 27—37.
- Dettman J. R., Taylor J. W. 2004. Mutation and evolution of microsatellite loci in *Neurospora*. *Genetics*. 168 (3) : 1231—1248.
- Estrada M. E., Camacho M. V., Benito C. 2007. The molecular diversity of different isolated of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using intermicrosatellite (ISSRs). *Cellular and Molecular Biology Letters*. 12 (2) : 240—252.
- Gauthier N., Dalleau-Clouet C., Fargues J., Bon M.-C. 2007. Microsatellite variability in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*: genetic diversity and population structure. *Mycologia*. 99 (5) : 693—704.
- Gramaje D., León M., Santana M., Crous P. W., Armengol J. 2014. Multilocus ISSR markers reveal two major genetic groups in Spanish and South African populations of the grapevine fungal pathogen *Cadophora luteo-olivacea*. *PLoS One*. 9 (10) : e110417.
- Hammock E. A., Young L. J. 2005. Microsatellite instability generates diversity in brain and sociobehavioral traits. *Science*. 308 (5728) : 1630—1634.
- Kamata N. 2000. Population dynamics of the beech caterpillar, *Syntypistis punctatella*, and biotic and abiotic factors. *Population Ecology*. 42 (3) : 267—278.
- Kryukov V. Yu., Yaroslavtseva O. N., Levchenko M. V., Lednyov G. R., Glupov V. V. 2010. Phenotypic variability of environmental isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology (Moscow)*. 79 (2) : 265—269.
- Kryukov V. Yu., Yaroslavtseva O. N., Elisaphenko E. A., Mitkovets P. V., Lednev G. R., Duisembekov B. A., Zakian S. M., Glupov V. V. 2012. Change in the

- temperature preferences of *Beauveria bassiana sensu lato* isolates in the latitude gradient of Siberia and Kazakhstan. *Microbiology (Moscow)*. 81 (4) : 453—459.
- Kryukov V. Yu., Yaroslavtseva O. N., Lednev G. R., Borisov B. A. 2011. Local epizootics caused by teleomorphic cordycipitoid fungi (*Ascomycota: Hypocreales*) in populations of forest lepidopterans and sawflies of the summer-autumn complex in Siberia. *Microbiology (Moscow)*. 80 (2) : 286—296.
- Lacey L. A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D. I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M. S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*. 132 : 1—41.
- Liang H.-H., Cheng Zh., Yang X.-L., Li Sh., Ding Z.-Q., Zhou T.-Sh., Zhang W.-J., Chen J.-K. 2008. Genetic diversity and structure of *Cordyceps sinensis* populations from extensive geographical regions in China as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *The Journal of Microbiology*. 46 (5) : 549—556.
- Masri L., Branca A., Sheppard A. E., Pakkou A., Laehnemann D., Guenther P. S., Prah S., Saebelfeld M., Hollensteiner J., Liesegang H., Brzuszkiewicz E., Daniel R., Michiels N. K., Schulte R. D., Kurtz J., Rosenstiel P., Telschow A., Bornberger R., Schulenburg H. 2015. Host — pathogen coevolution: the selective advantage of *Bacillus thuringiensis* virulence and its cry toxin genes. *PLOS Biology*. 13 (6) : e1002169.
- Meyling N. V., Lübeck M., Buckley E. P., Eilenberg J., Rehner S. A. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular Ecology*. 18 : 1282—1293.
- Michael T. P., Park S., Kim T.-S., Booth J., Byer A., Sun Q., Chory J., Lee K. 2007. Simple Sequence Repeats Provide a Substrate for Phenotypic Variation in the *Neurospora crassa* Circadian Clock. *PLoS ONE*. 8 : e795.
- Rehner S. A., Buckley E. A. 2005. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*. 97 (1) : 84—98.
- Safavi S. A., Shah F. A., Pakdel A. K., Rasoulia G. R., Bandani A. R., Butt T. M. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*. 270 (1) : 116—123.
- Scully L. R., Bidochka M. J. 2006. The host acts as a genetic bottleneck during serial infections: an insect-fungal model system. *Current Genetics*. 50 (5) : 335—345.
- Shah F. A., Wang C. S., Butt T. M. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 251 : 259—266.
- Vandenbergh J. D., Cantone F. A. 2004. Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth *in vitro*, virulence, and host specificity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85 (1) : 40—45.
- Vega F. E., Goette L. M. S., Blackwell M., Chandler D., Jackson M. A., Keller S., Koike M., Maniania N. K., Monzon A., Ownley B. H., Pell J. K., Rangel D. E., N., Roy H. E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*. 2 : 149—159.
- Wang S., Miao X., Zhao W., Huang B., Fan M., Li Z., Huang Y. 2005. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycological Research*. 109 (12) : 1364—1372.
- Wyrebek M., Bidochka M. J. 2013. Variability in the insect and plant adhesions, *Mad1* and *Mad2*, within the fungal genus *Metarhizium* suggest plant adaptation as an evolutionary force. *PLoS ONE*, 8 (3) : j.p.0059357.
- Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*. 17 (6) : 553—596.

PHENOTYPIC AND GENETIC CHANGES
OF ENTOMOPATHOGENIC ASCOMYCETE *BEAUVERIA BASSIANA*
UNDER PASSAGING THROUGH VARIOUS HOSTS

V. Yu. Kryukov, U. N. Rotskaya, O. N. Yaroslavtseva,
E. A. Elisaphenko, B. A. Duisembekov, V. V. Glupov

Key words: entomopathogens, ascomycetes, passaging, epizootic, ISSR, variability.

SUMMARY

Phenotypic and genetic estimations of entomopathogenic ascomycete *B. bassiana* (strain Sar-31) after 6-passaging through four hosts were shown. Increasing of virulence, changes in morpho-cultural characteristics and variations in Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) assay between initial and reisolated cultures were registered.

Six passages of entomopathogenic ascomycete *Beauveria bassiana* (strain Sar-31) through four hosts (*Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Locusta migratoria*) and following estimation of phenotypic and genetic differences of the initial strain and reisolated cultures were conducted. The passaging of strain through certain host led to increasing of virulence for both this host and other test-insects. Unidirectional changes of morpho-cultural characteristics: colonies pigmentation and relief strengthening, increasing of conidia production and lipolytic activity were registered in all passaged cultures. Genetic analysis with 6 ISSR markers revealed variations between initial and reisolated cultures in 3 markers. Taken together, the results of this study help us understand potential ways of fungi strains changes during epizootic process and possibilities of ISSR assay applying for investigation of pathogen transmission.