

ЕНТОМОПАТОГЕННІ НЕМАТОДИ

в агроценозах України та методи їх виявлення

Обстеження агроценозів Київської та Чернігівської областей на заселеність ентомопатогенними нематодами показало, що із 157 проаналізованих проб (грунтові проби, живі пастки) 28 (17,8%) виявились зараженими нематодами родів *Steinernema* та *Heterorhabditis*. Наведено порівняльний аналіз існуючих методів виділення ентомопатогенних нематод із комах-живителів.

ентомопатогенні нематоди, ґрунтові проби, живі пастки, методи виділення, інвазійні личинки, хрущ травневий

Ще 20 років тому не більше шести вчених у всьому світі займались вивченням ентомопатогенних нематод (ЕПН). Нині вивченням ЕПН займаються понад 100 лабораторій в 50-ти країнах світу.

Для використання в біозахисті найперспективнішими вважаються нематоди родів *Steinernema* та *Heterorhabditis* через їх мутуалістичні зв'язки з бактеріями роду *Enterobacter*, які мають летальну дію на комах.

У тілі комах нематоди розвиваються протягом 10–20 днів. Якщо при зараженні в неї проникли одиничні особини нематод, то наприкінці розвитку в навколишнє середовище мігрують десятки і сотні тисяч нематод, здатних заразити нових комах [1]. ЕПН пристосовані до тривалого існування в ґрунті без живлення, стійкі до багатьох засобів захисту рослин. Їх можна вносити в ґрунт і на поверхню рослин будь-яким типом обприскувачів. Стійкість проти сучасних пестицидів [2] і безпечність для людини, теплокровних тварин і рослин дозволяє використовувати ЕПН в якості засобу захисту від шкідливих комах [3].

Спектр використання ентомопатогенних нематод досить широкий: проти личинок довгоносиків, гусені плодоярок, колорадського жука та ін. Проте найбільше значення вони мають у захисті від прихованоживучих шкідників, які розвиваються у ґрунті на коренях рослин, в стеблах, на стовбурах дерев. Ці комах важко-

Д.Д. СІГАРЬОВА,
доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НААН

В.В. ХАРЧЕНКО,
аспірант
Інститут захисту рослин НААН
вул. Васильківська, 33, м. Київ,
03022, Україна
E-mail: dd.sigareva@ukr.net

доступні для хімічних обробок та характеризуються великою резистентністю до пестицидів. Біопрепарати на основі ентомопатогенних нематод дають можливість розв'язувати проблему захисту рослин від ґрунтоживучих та прихованоживучих шкідників.

Одним із ключових етапів ефективного застосування ЕПН є розробка простих та дешевих способів їх масового розмноження [4, 5].

Нині вже існують методи масового напрацювання ЕПН як на личинках комах, так і на штучних живильних середовищах.

Воскова міль (*Galeria melonella*) вважається одним з найкращих комах-хазяїв для розмноження ентомопатогенних нематод *in vivo* [6]. Нині ЕПН культивують на них для масового одержання інвазійних личинок. Для

розмноження ентомопатогенних нематод можливе також використання совки капустиної (*Barathra brassicae*), а також личинки мучного хрущака (*Tenebrio molitor*) [7, 8]. За вдалого зараження якісних гусеней можливо отримати від 100 до 350 тисяч інвазійних личинок з однієї комах.

В Україні розробки щодо використання ЕПН і створення на їх основі біопрепаратів (за невеликим винятком) практично відсутні. Тому роботи в цьому напрямі будуть перспективними як в галузі збереження врожаю сільськогосподарських культур так і в галузі охорони навколишнього середовища.

Одним із головних завдань наших досліджень було виявлення місцевих популяцій ЕПН, щоб мати можливість їх розмножувати і застосовувати. Влітку протягом 2016–2017 рр. були закладені польові дослідні в різних біоценозах та взяті ґрунтові зразки для проведення лабораторних експериментів щодо заселення їх ЕПН.

Методи виявлення. Біоценоз для відбору ґрунтових зразків та закладання живих пасток вибирали на основі проаналізованих літературних даних та спонтанно на місцевості, залежно від різноманітних факторів. За відбору ґрунтових проб



Виділення ентомопатогенних нематод із ґрунтових проб в лабораторних умовах (ориг. Харченко)

у садових біоценозах вибирали ділянки по 4 м² під кроною дерева; у польових агроценозах місце відбору особливого значення не мало. Критерієм для визначення кількості відібраних ґрунтових зразків було те, що сумарна площа, на якій відбирали ґрунтові зразки, становила близько 10% загальної площі аналізованої території.

На обраній ділянці викопували 5 ґрунтових зразків, з яких формували 1 ґрунтову пробу загальною масою 300—350 г. У лабораторії відібрані ґрунтові проби пересівали на ентомологічних ситах (діаметр комірки 2—4 мм) і набивали в стакани місткістю 300 мл, куди потім розміщали по 2 личинки тест-комаха передлялькової стадії. Стакани накривали цупкою тканиною, а потім виставляли догори дном на пластмасові піддони. Закладали живі пастки в біоценозах методом закопування у ґрунт на глибину 10—15 см сітчастих сфер-коробочок (чайні ситечка) із розміщеними в них личинками воскової молі (чи ін. тест-комаха). Через 4—7 днів ситечка викопували, а життєздатність комах перевіряли.

Спостереження за станом комах-хазяїв, виставлених в ґрунтових пробах та живих пастках, проводили щодня протягом тижня, і якщо знаходили мертвих, то їх вилучали і виставляли на модифіковані пастки Уайта (із вологим фільтрувальним папером). Тримати тестових комах більше тижня не має сенсу, адже якщо в ґрунтовій пробі і були ЕПН, то вони заразили б личинок галерії чи інших комах.

Частину комах було перевірено шляхом препарування. Препарували в основному тих тест-комаха, з яких міграції інвазійних личинок ЕПН не спостерігалось впродовж тривалого часу (більше 10 днів). Також препарції підлягали ті комахи, на яких нематодне зараження не спостерігалось візуально. У випадку якщо за розтину під біокуляром спостерігались личинки ЕПН, комах повертали назад у чашки Петрі для продовження виділення. Ми також провели експеримент з повторного занесення тест-комаха у ґрунтові проби, в яких спостерігали загибель всіх попередніх тест-комаха. Через тиждень після повторного внесення комахи залишались живими. Тобто повторне внесення не дало результатів, а це свідчить, що всі нематоди які були в ґрунтовій пробі, проникли в первинно розміщених

личинок комах. В якості комах-живителя використовували личинок воскової молі, хруща травневого і малиново-суничного довгоносика.

Зараженість ЕПН різних біоценозів

Відбір ґрунтових проб та розміщення живих пасток проводили в різноманітних біо- та агроценозах Центрального та Південного Полісся (центральна та південна частина Чернігівської та центральна частина Київської областей) з метою визначення найбільш оптимальних ценозів для ентомонематод. Зокрема досліди проводили в Чернігівському (с. Боромики), Козелецькому (с. Чемер, с. Морівськ, м. Остер) районах Чернігівської області, Бородянському (с. Козинці), Києво-Святошинському (с. Новосілки), Баришівському (дачний масив поблизу смт Баришівка) районах Київської області.

Загалом було закладено 70 живих пасток, та сформовано 87 ґрунтових проб, в які були розміщені личинки воскової молі для виявлення заселеності ґрунту ентомопатогенними нематодами (табл. 1).

Із 157 опрацьованих проб (ґрунтові проби і живі пастки) 28 дали

позитивний результат. Тобто із загальної кількості проб, відібраних у агроценозах Київської та Чернігівської областей, зараженими виявились майже 5-та частина (17,8%) (рис.).

Використання двох різних методів виявлення ЕПН в ґрунті показало їх неоднакову ефективність (табл. 1). Більш ефективним виявився метод живих пасток, при застосуванні якого в природних умовах заражених личинок воскової молі було 19,0%, а за аналізу ґрунтових проб в лабораторних умовах їх кількість не перевищувала 9,0%, тобто вдвічі менша. Можливою причиною цього явища можуть бути більш природні умови для личинок ЕПН у першому випадку.

За обстеження біоценозів на заселеність ентомопатогенними нематодами можна прослідкувати тенденцію, які саме агробіоценози є сприятливішими щодо ЕПН. Дослідами встановлено, що на дачному масиві біля смт Баришівка зараженими виявились досить значна кількість як ґрунтових зразків так і живих пасток, відібраних в ценозах обліпихи та горіха. В загальному ж садові агроценози є більш заселеними ніж польові, це можна пояснити

1. Заселеність ЕПН відібраних ґрунтових проб та живих пасток

Місце відбору	Відібрані ґрунтові проби			Закладені живі пастки		
	Кількість, шт.	Заселеність		Кількість, шт.	Заселеність	
		шт.	%		шт.	%
Дачний масив біля смт Баришівка	12	8	66,7	16	9	56,2
с. Морівськ	18	0	0	35	5	14,3
м. Остер	0	0	0	3	1	33,3
с. Козинці	3	0	0	0	0	0
с. Боромики	16	0	0	16	4	25
с. Новосілки	8	0	0	0	0	0
с. Чемер	30	1	3,33	0	0	0
Всього	87	9	10,3	70	19	27,1



Рис. Співвідношення між кількістю чистих проб та проб, заражених ЕПН

більшою часовою стабільністю їх існування і незмінними культурами-домінантами та меншою інтенсивністю хімічних обробок (табл. 2). Зовнішній вигляд загиблих личинок хруща вказує на те, що були присутні ЕПН двох родів, а саме: *Steinernema* та *Heterorhabditis*.

2. Обстеження біоценозів на зараженість ЕПН

Біоценоз	Відібрано проб			
	Грунтові проби		Живі пастки	
	загалом	заражено	загалом	заражено
Дачний масив біля смт Баришівка				
Обліпиха	3 (1)	1	3	2
Горіх	1	1	1	1
Калина	1	0	1	0
Яблуна	1	1	1	0
Шовковиця	1	1	1	1
Абрикос	1	1	1	1
Ялівець	1	0	1	1
Туя	1	1	1	1
Квасоля	2	0	2	1
Соняшник-гарбуз	2	0	2	1
Груша	1	1	1	0
Слива	1	1	1	0
с. Козинці				
Черешня	1	0	0	0
Яблуна	1	0	0	0
Картопля	1	0	0	0
с. Морівськ				
Соняшник	0	0	3	3
Гречка	15	0	32	2
Овес	3	0	0	0
м. Остер				
Яблуна	0	0	3	1
с. Боромики				
Яблуна	9	0	9	2
Вишня	2	0	2	0
Слива	2	0	2	0
Груша	1	0	1	0
Люцерна	2	0	2	0
с. Чемер				
Полуниця	18	1	0	0
Чорниця	12	0	0	0
с. Новосілки				
Слива	10	0	0	0

Зараження ЕПН личинок воскової молі, хруща травневого та малиново-сунічного довгоносики в лабораторних умовах

Проведено експеримент щодо штучного зараження ЕПН личинок воскової молі, хруща травневого і малиново-сунічного довгоносики в лабораторних умовах. Грунт, в якому природно популяцію ЕПН не було виявлено, штучно заражали личинками *Steinernema feltiae* (із препарату «Ентонем»). Суспензію личинок *Steinernema feltiae* в кількості 5 тисяч вносили в 250-грамові стакани з ґрунтом, куди вносили тест-комах. Життєздатність тест-комах перевіряли та фіксували щодня протягом тижня. Як видно з наведених в таблиці 3 даних на 2–5-й день спостерігалась майже 100% загибель тест-комах.

Личинки хруща і довгоносики, заражені *S. feltiae* загинули через 2 дні після внесення інвазії, а личинки молі — через 5 днів. Смерть тест-комах відбувалася значно швидше при зараженні *Steinernema feltiae* ніж на природньому фоні. Можливо причиною цього є більша інвазійна активність нематод в «Ентонемі» і більше навантаження за штучного зараження.

Оцінка сучасних методів виділення личинок ЕПН із трупів загиблих комах

Досліджуючи мертвих личинок слід пам'ятати, що не всі мертві комахи загинули саме від ентомопатогенних нематод. Перевірити чи саме від ЕПН загинула личинка тест-комах можна двома способами. *Перший спосіб*: розірвати (препарувати) мертву личинку і перевірити внутрішній вміст під мікроскопом (біокуляром). *Другий спосіб*: зберегти тест-комах цілими, та залишити їх для подальшого виділення личинок ЕПН. Саме з цією метою Уайт (White, 1924) розробив та запропонував метод водних пасток,

а Орозко (Orozko, 2014) його дещо модифікувала.

За Методом Уайта в чашку Петрі великого діаметра, в якій знаходиться змочений водою фільтрувальний папір, поміщали досліджуваній об'єкт.

З метою удосконалення методу водних пасток Уайта Орозко запропонувала спосіб, при якому фільтрувальний папір залишається сухим. Тобто в чашку Петрі поміщають меншу чашку, на дно якої кладуть фільтрувальний папір, при цьому він завжди залишається сухим.

Ми використовували метод Орозко і метод Уайта, який дещо змінювали. У велику чашку Петрі розміщували перевернуту чашку меншого розміру, на яку поміщали фільтрувальний папір таким чином, щоб його кінці знаходились у воді. Це дає змогу підтримувати фільтрувальний папір завжди вологим. Зверху на папір клали мертву личинку.

Застосування обох методів у досліді щодо розмноження на личинках хруща травневого двох ізолятів (*Steinernema feltiae* та *Steinernema sp.*) дало змогу їх порівняти (табл. 4).

Личинки хруща, які загинули від зараження двох ізолятів ЕПН (*Steinernema feltiae* та *Steinernema sp.*), для отримання інвазійних личинок ентомонематод були розміщені в чашки Петрі двома методами: Уайта (White, 1924) та Орозко (Orozko, 2014). В таблиці 4 наведено дані щодо початку, кінця й ефективності цього процесу. Найпомітнішою різницею між цими двома методами слід вважати початок виділення нематод з трупів комах. При застосуванні методу Уайта личинки почали виходити вже на 2–5-й день, в той час як за методом Орозко вихід личинок розпочинався на 10–12-й день, тобто майже на тиждень пізніше. Це явище можна пояснити тим, що вологе середовище, яке створюється в чашках Петрі за методом

3. Ефективність дії «Ентонему» на тест-комах в лабораторних умовах

Кількість дослідних зразків	Вид тест-комах	Кількість тест-комах		Дата зараження	Дата загибелі	Загиблих комах	
		В 1 зразку	Всього			шт.	%
1	Хрущ травневий	5	5	17,05	19,05	5	100
14	Міль воскова	2	28	01,06	06,06	28	100
2		10	20	30,03	04,04	19	95
7	Довгоносики малиново-сунічний	7	7	03,07	05,07	7	100

4. Порівняльна ефективність різних методів виділення личинок ЕПН із заражених комах хруща

Ізолят ЕПН	Метод виділення	Кількість комах хруща	Початок виділення (днів після загибелі)	Тривалість виділення (днів після початку)	Середня чисельність личинок ЕПН, виділених з однієї комах
<i>Steinernema feltia</i>	Орозко	3	12 (5—15)	48 (40—56)	121748 (91728—151768)
	Уайта	3	2 (1—3)	46 (38—53)	99614 (53803—131344)
Середнє					110481 (53803—151768)
<i>Steinernema sp.</i>	Орозко	3	10 (9—11)	41 (38—43)	69067 (32666—126992)
	Уайта	3	5	49	115669 (95094—134987)
Середнє					92369 (32666—134987)

Уайта, для личинок нематод більш природне, ніж сухе — яке властиве методу Орозко.

Щодо тривалості виходу личинок ЕПН із трупів комах, то тут також перевагу слід надати методу Уайта, за якого личинки мігрують протягом 49 днів, в той час як за методом Орозко цей процес дещо коротший (38—46 днів).

Зрозуміло, що для оцінювання методів виділення має значення і їх продуктивність, тобто загальна кількість виділених личинок нематод. В одному випадку (з ізолятом *Steinernema sp.*) застосування методу Уайта дало можливість отримати майже вдвічі більше личинок нема-

тод. В іншому випадку (з ізолятом *Steinernema feltia*) перевагу слід надати методу Орозко, за використання якого з однієї личинки хруща отримано на 18% більше личинок ЕПН ніж за методом Уайта.

Для отримання додаткової уточнюючої інформації ці дослідження слід продовжити.

ВИСНОВКИ

1. Для проведення дослідів щодо використання ЕПН в біологічних методах захисту рослин потрібна лабораторно напрацьована масова культура личинок ЕПН місцевих ізолятів.

2. Обстеження агроценозів та біоценозів в Київській та Чернігівській областях показало, що в переважній більшості вони заражені ЕПН. Із 157 досліджених ґрунтових проб ентомопатогенні нематоди виявлені у 28-ми пробах, тобто 18,8% проб.

3. Застосування різних методів обстеження (живі пастки та лабораторний аналіз ґрунтових проб) з використанням личинок воскової молі засвідчило вдвічі вищу ефективність живих пасток.

4. Для виділення личинок ЕПН із заражених трупів комах-живителів доцільно застосовувати метод Уайта, при якому вихід личинок починається значно раніше ніж при використанні методу Орозко (відповідно на 2—5-й день проти 10—12-го), що можна пояснити вологим середовищем першого методу, яке більш природне для личинок ЕПН.

ЛІТЕРАТУРА

- Сигарева Д.Д., Олененко В.В. Количесство генераций энтомопатогенных нематод *Steinernema feltia* и *Heterorhabditis bacteriophora* при культивировании на гусеницах *Galleria mellonella*. Информ. бюл. Междунар. орг-ции по биол. борьбе с вредными животными и растениями. Киев, 2009. Вып. 39. С. 162—166.
- Безрученко Н.Н. Влияние инсектицидов на энтомопатогенные нематоды. Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук: научно-практический журнал. 2010. № 1. С. 67—71.
- Poinar G.O. Nematodes for biological control of insects. CRC Press INC. 1979. 277 pp.
- Жиляева И.И., Ежов Г.И., Кондратов Е.С. Разведение энтомопатогенных нематод *Neoplectana carposapsae* «agriotes» (Веремчук 1972) на гусеницах капустной совки *Varathra brassicae*. Материалы научной конференции ВОГ. 1973. Вып. 25. С. 97—102.
- Gaugler R., Georgis R. Culture and method and efficiency of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Biological Control*. 1991. 1. P. 269—274.
- Woodring J.L., Kaya H.K. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A Handbook of Techniques, Southern Coop. Ser. Bull. 331, Arkansas Agri. Exp. St. Fayetteville, AZ., 1988. 29 p.
- Блинова С.Л., Иванова Е.С. О культивировании нематодно-бактериального комплекса *Neoplectana carposapsae* «agriotes». Гельминты насекомых. Москва: Наука, 1980. С. 17—19.
- Ehlers R-U. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. Vol. 56. P. 623—633.

Сигарева Д.Д., Харченко В.В.

Энтомопатогенные нематоды в агроценозах Украины и методы их выявления

Обследование агроценозов Киевской и Черниговской областей на заселенность энтомопатогенными нематодами показало, что из 157 проанализированных проб (грунтовые пробы, живые ловушки) 28 (17,8%) заражены нематодами родов *Steinernema* и *Heterorhabditis*. Приведен сравнительный анализ существующих методов выделения энтомопатогенных нематод из насекомых-хозяев.

энтомопатогенные нематоды, ґрунтовые пробы, живые ловушки, методы выявления, инвазионные личинки, майский жук

Sigareva D., Kharchenko V.

Entomopathogenic nematodes in agrocensuses of Ukraine and methods of their detection

The survey of agrocensuses in the Kyiv and Chernihiv regions for the population of entomopathogenic nematodes showed that of 157 analyzed samples (soil samples, live traps) 28 (17.8%) of them were infected with nematodes of genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*. The comparative analysis of existing methods of isolation of entomopathogenic nematodes from insects-feeders is given.

entomopathogenic nematodes, soil samples, live traps, methods of isolation, invasive larvae, May bug



Самка 1-ї генерації *Steinernema sp.* заповнена ювенільними личинками (явище «*Endotokia matricida*») (ориг. Харченко)