

УДК 595:729:631:544:634

СІГАРЬОВА Д.Д., чл.-кор. НААН

ГАЛАГАН Т.О., канд. біол. наук

ДОВГЕЛЯ В.М., канд. с.-г. наук

ГРАЦІАНОВА Н.В., аспірант

ОЛЕНЕНКО В.В., аспірант

*Інститут захисту рослин НААН*

БОКШАН О.Я., канд. біол. наук

ЖУРАВЧАК Т.М., наук. співробітник

*Закарпатський територіальний центр карантину рослин ІЗР НААН*

## ОЦІНКА ІНВАЗІЙНОЇ АКТИВНОСТІ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ НЕМАТОД РР. *STEINERNEMA* ТА *HETERORHABDITIS* ВІДНОСНО КОМАХ

Досліджені інвазійні, міграційні та репродуктивні властивості місцевих ізолятів ентомонематод родів *Steinernema* та *Heterorhabditis* відносно гусениць воскової молі, імаго вовчка звичайного та клопа-москаля; личинок західного травневого жука, жука-носорога, звичайного бурякового довгоносика, коваликів посівного та буруногого, діабротики тощо.

**Ключові слова:** ентомопатогенні нематоди, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, воскова міль, вовчок звичайний, клоп-москаль, західний травневий хрущ, жук-носорог, звичайний буряковий довгоносик, ковалик посівний, ковалик буруногий, діабротика, інвазійна активність, міграція, інвазійний вихід.

**Постановка проблеми.** Дослідження, проведені в різних країнах світу, показали, що ентомопатогенні нематоди родів *Steinernema* та *Heterorhabditis* мають ряд суттєвих ознак, які забезпечують можливість їх використання для створення біологічних препаратів. Ентомонематоди мають широке коло комах-господарів (здатні уражувати більше 1000 видів комах). Вони більш ефективні, ніж хімічні інсектициди проти ґрунтоживучих та прихованоживучих комах. Біопрепарати на основі цих нематод безпечні та можуть застосовуватись проти приховано живучих шкідників на квітково-декоративних рослинах у відкритому та закритому ґрунті.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Однією з найважливіших характеристик ентомонематод є їх інвазійність (інфекційність, вірулентність, інвазійна активність), тобто здатність нематодно-бактеріального комплексу проникати і вбивати комаху-господаря [1]. Практичне застосування ентомопатогенних нематод в регулюванні чисельності комах-шкідників вимагає розробки методів оцінки інвазійної активності патогенів [2]. Різні ізоляти нематод володіють різним ступенем інвазійності. Більш того, відрізняється і чутливість до них різних видів шкідників [3]. Здебільшого біопроба на інфекційність оснований на експозиції цільового виду комах разом з личинками нематод на різних субстратах (фільтрувальний папір, пісок). Єдиним критерієм оцінки інвазійності в таких дослідах є рівень смертності комах-господарів за певний проміжок часу або швидкість та ступінь проникнення нематод [3, 4, 5]. Основними факторами, що впливають на швидкість проникнення, вважаються: вид нематод, умови проведення дослідів (лабораторні чи польові), субстрат та розташування личинок комах-принад, вологість та температура, періоди обліків. Отже, при вивченні інвазійності важливо пам'ятати, що отримання надійних результатів можливе лише при врахуванні всіх факторів, які на цей процес впливають.

Загальноприйнятою методикою дослідження інвазійності нематод передбачається використання як тест-об'єкта гусениць великої воциної молі (*Galleria mellonella* L.) [6]. Можливе також використання інших видів комах, наприклад, личинок останнього віку борозенчастого скосяря (*Otiiorhynchus sulcatus* F.) [7]. Зважаючи на те, що гусінь галерії є надчутливою до нематодної інвазії, отримані за їх допомогою залежності доза-смертність часто виявляються хибними для інших видів комах. Отже, перед закладанням польових дослідів, велике значення має попереднє випробування нематод щодо їх інвазійності до певних видів шкідників [7, 8].

В дослідженні ефективності різних ізолятів ентомопатогенних нематод важливим також є показник кількісного виходу інвазійних личинок з трупів комах-шкідників. Личинки, що

мігрували, здатні тривалий час зберігатись в ґрунті, не втрачаючи своїх патогенних властивостей, а, отже, відшукувати і заражати нових господарів. Цей показник є важливим при плануванні заходів захисту рослин, насамперед для прийняття рішень щодо встановлення кратності обробок.

При дослідженні міграційної активності та репродуктивного потенціалу гетерорабдитид та штейнернематид в гусені галерії помічено, що вихід інвазійних личинок спостерігався тільки з фізіологічно повноцінних гусениць, а фізіологічно неповноцінні – практично не давали виходу інвазійного матеріалу [9]. Це, очевидно, притаманне і іншим комахам.

**Метою роботи** було дослідження інвазійності нематод, що є важливим етапом в методології створення препаратів на їх основі.

**Завданнями досліджень** було передбачено оцінити інвазійну активність місцевих ізолятів ентомопатогенних нематод рр. *Steinernema* і *Heterorhabditis* відносно різних комах-шкідників та провести спостереження за міграційною активністю і репродуктивним потенціалом ентомогельмінтів при їх пасажі на різних живителів.

**Матеріали і методи досліджень.** Досліди проводили з травня до серпня 2009 року в лабораторії нематології Інституту захисту рослин та в Закарпатському територіальному центрі карантину рослин НААН.

В досліді випробували 14 ізолятів ентомопатогенних нематод. Всі ізоляти роду *Heterorhabditis* були виділені з різних біоценозів АР Крим, в той час як штейнернеми мають походження з різних регіонів України.

Для вивчення інвазійної активності місцевих ізолятів ентомонематод водною суспензією інвазійних личинок обробляли гусениць галерії (*Galleria mellonella* L.), личинок 3-4 віку та імаго західного травневого хруща (*Melolontha melolontha* L.), імаго вовчка звичайного (*Gryllotalpa gryllotalpa* L.), личинок коваликів посівного (*Agriotes sputator* L.) та буруного (*Melanotus brunnipes* Germ.), личинок останнього віку діабротики (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte), личинок звичайного бурякового довгоносика (*Bothynoderes punctiventris* Lerm.), личинок жука-носорога (*Oryctes nasicornis* L.) та імаго клопа-москаля (*Pyrrhocoris apterus* L.). Зараження проводили на стерильній ваті в чашках Петрі, які потім тримали в термостаті за температури 25 °С. Досліди закладали в 10-13 повторностях, де за повторність приймали 1 комаху. Варіанти досліду відповідали кількості досліджуваних ізолятів. Інвазійне навантаження становило 100 та 300 личинок нематод на 1 особину комах. Щодня виймали комах, що загинули, і викладали їх на водні пастки Уайта [10], спостерігаючи за початком міграції. Через кожні 7 днів підраховували нематоди, що мігрували у воду. Облік проводили до повного закінчення міграційної активності. Підрахунок здійснювали в титрі суспензії під біокуляром МБС-10. Для нівелювання впливу маси на кількісні показники виходу інвазійних личинок нематод, для кожного варіанта досліду відбирали комах одного віку з приблизно однаковою масою.

З роду *Steinernema* були досліджені наступні ізоляти: *Steinernema ZAK* (агроценоз Закарпаття); *Steinernema SPB5*, *Steinernema ZH* (агроценоз Хмельницька обл.); *Steinernema PREST* (агроценоз Київська обл.); *Steinernema AK*, *Steinernema LIM* (природний ценоз, степовий Крим).

З роду *Heterorhabditis* – такі: *Heterorhabditis F5*, *Heterorhabditis F7*, *Heterorhabditis F3* (природний ценоз, степовий Крим); *Heterorhabditis RS* (розарій, Сімферопольський ботсад); *Heterorhabditis A-19*, *Heterorhabditis A-13*, *Heterorhabditis A-20* (аличевий сад, степовий Крим); *Heterorhabditis YAKR* (яблуневий сад, степовий Крим).

Для отримання достатньої кількості інвазійного матеріалу, виділені ізоляти нематод культивували на гусені великої вошинної молі та зберігали за температури 4-5 °С.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Найбільшу кількість ізолятів випробували на гусені великої вошинної молі. Встановлено, що при обробці гусені галерії водною суспензією нематод в дозі 100 інфекційних особин на 1 комаху, загинуть її від ізолятів *Steinernema ZH*, *Steinernema LIM* та *Heterorhabditis F3*, *F5*, *F7*, *RS* відбувалась на 2-3 день після ураження; на 3-5 день – від представників *Heterorhabditis A 13*, *A 19*; на 5-6 – від нематод ізоляту *Heterorhabditis A 20*. Слід зазначити, що лише 2 з досліджуваних ізолятів (*Heterorhabditis A 13* та *A 19*) давали 70 % загинуть галерії, решта ізолятів забезпечували 100 % смертність тест-об'єкта.

Для з'ясування інвазійної активності ентомонематод щодо личинок травневого хруща були застосовані 6 ізолятів, а саме: *Steinernema ZAK*, *Steinernema SPB5*, *Steinernema PREST*, *Heterorhabditis F5*, *Heterorhabditis RS* та *Heterorhabditis YAKR*. При дозі зараження 100 особин нематод на 1 комаху загинуть фітофагів спостерігалась на 2-6 день для штейнернем та на 2-4

день для гетерорабдитисів. Рівень смертності хрущів від ізолятів *Steinernema SPB5*, *Steinernema ZAK* та *Heterorhabditis F5* досягав 100 %. Низький рівень смертності (33,3 %) зафіксований при застосуванні ізоляту *Heterorhabditis RS*. Рештою ізолятів личинки хрущів не уражувались. При дослідженні чутливості імаго західного травневого хруща до нематодної інвазії відмічено, що серед 4 ізолятів штейнернем і гетерорабдитисів патогенним виявився тільки ізолят *Steinernema PREST*, проте чутливість до нього комах не перевищувала 6,7 %. До решти ізолятів, а саме: *Steinernema ZAK*, *Heterorhabditis F5* та *Heterorhabditis YAKR* імаго хруща були стійкими.

По 4 ізоляти випробували проти імаго вовчка звичайного та дротяників. Проте інвазійне навантаження було вищим, ніж у попередніх дослідах і становило 300 нематод на 1 комаху. Імаго вовчка звичайного заражали ізолятами: *Steinernema ZAK*, *Steinernema SPB5*, *Heterorhabditis F5*, *Heterorhabditis RS*. При випробуванні ізолятів *Heterorhabditis F5* та *Steinernema ZAK* відмічалась 100 % загибель комах на 3-9-й день після зараження. Ізоляти *Steinernema SPB5* та *Heterorhabditis RS* виявили дуже низьку патогенність відносно вовчка. Смертність шкідника була на рівні 10 %.

При дослідженні ефективності зараження ентомонематодами дротяників, чашки Петрі з личинками коваликів, як і в попередньому досліді, обробляли суспензіями нематод в дозі 300 інвазійних личинок на 1 комаху, проте ізоляти нематод були інші. Загибель личинок спостерігалась на 2-3-й день після зараження. Смертність була на рівні 10 та 50 % для *Heterorhabditis A 20* та *Heterorhabditis F5*, відповідно. Ізолятами *Steinernema SPB5* та *Heterorhabditis F3* дротяники не уражувались.

Щодо діабротики та звичайного бурякового довгоносика випробували лише один ізолят, а саме – *Heterorhabditis F5*. При зараженні личинок останнього віку діабротики інвазійними личинками з розрахунку 100 інфекційних нематод на 1 комаху, відмічено, що процес інфікування розпочався наступного дня після зараження, коли загинула 1 з 13 личинок, що склало 7,69 %. На 3-й день загинула найбільша кількість комах – 6 або 46,15 %; на 4-й, 5-й, 6-й дні загинуло 2(15,38 %), 3(23,08 %), 1(7,69 %) личинки, відповідно. За 6 днів експозиції зафіксована 100 % загибель діабротики.

Децю іншу динаміку інвазійної активності спостерігали при зараженні тією ж дозою нематод личинок звичайного бурякового довгоносика. На третій день після обробітку загинула 1 з 13 личинок шкідника, або 7,69 %; на 4-й день – 9 личинок (69,23 %); решта личинок (23,08 %) – наступного дня. Загалом, на 5-й день після ураження спостерігалась 100% загибель довгоносиків. В повторному досліді зафіксована 100 % загибель шкідника на 3-й день після ураження. Отже, ізолят *Heterorhabditis F5* показав у лабораторних дослідженнях високу ефективність проти діабротики та звичайного бурякового довгоносика.

Три види досліджуваних комах, а саме личинки ковалика бурого ( *Melanotus brunnipes Germ.* ), жука-носорога ( *Oryctes nasicornis L.* ) та імаго клопа-москаля ( *Pyrrhocoris apterus L.* ) виявились стійкими до ентомонематод.

Міграційну активність нематод встановлювали шляхом підрахунку інвазійних личинок, які виходили з трупів комах у водні пастки. Фіксували щотижневий вихід, початок та кінець міграції. В досліді з гусінню вошинної молі міграція починалась на 4-8-й день після загибелі гусені, тривала в середньому від 10 до 25 днів при дозі інвазії в 100 личинок на 1 комаху. Середній вихід штейнернем ( *Steinernema ZH* ) був менший порівняно з гетерорабдитисами і складав 9833,5 (3778-24316) екз. проти 14212,4 (6150-26048) екз. у нематод *Heterorhabditis F5* (табл. 1). При тій же дозі зараження міграція гетерорабдитид та штейнернематид з личинок травневого хруща розпочиналась на 5-7-й день після загибелі комах і тривала в середньому 4-5 тижнів. Середній вихід нематод складав 21974,7(3116-74880) екз. для *Steinernema SPB5* та 5115,5 (1747 -15360) екз. для *Steinernema ZAK*, а для ізоляту *Heterorhabditis F5* був на рівні 5914,8 (320-11200) екз.

Таблиця 1 – Міграція личинок ентомопатогенних нематод з трупів комах

Комаха	Ізолят нематод	Доза, нематод на 1 комаху	Міграція		Середній вихід нематод з 1 комахи, екз.
			початок (днів від загибелі)	тривалість, тижнів	
Вошинна міль	<i>Steinernema ZH</i>	100	4-8	1,5-3,5	9833,5 (3778-24316)
	<i>Heterorhabditis F5</i>	100	4-8	1,5 -3,5	14212,4 (6150-26048)
Травневий хрущ	<i>Steinernema SPB5</i>	100	5-7	4-5	21974,7 (3116-74880)
	<i>Steinernema ZAK</i>	100	5-7	4-5	5115,5 (1747-15360)
	<i>Heterorhabditis F5</i>	100	5-7	4-5	5914,8 (320-11200)

Вовчок звичайний	<i>Steinernema</i> ZAK	300	4-6	4-5	47950,1 (64-146400)
	<i>Heterorhabditis</i> F5	300	4-6	4-5	5135 (2508-7780)
Ковалик посівний	<i>Heterorhabditis</i> F5, A20	300	3-6	1-2	2908 (8-11000)
Діабротика	<i>Heterorhabditis</i> F5	100	4-7	3-4	5787,75 (600-10923)
Звичайний буряковий довгоносик	<i>Heterorhabditis</i> F5	100	4-7	3-4	36557,7 (1120-185760)

Для імаго вовчка звичайного рівень зараження був в три рази вищим (300 нематод на 1 комаху). В цих умовах міграція личинок нематод почалась на 4-6-й день після загибелі комах і тривала від 4 до 5 тижнів. Середній вихід штейнернематид ізоляту *Steinernema* ZAK становив 47950,1 (64-146400) екз., а гетерорабдитид ізоляту *Heterorhabditis* F5 – 5135 (2508-7780) екз. Отже, в цьому випадку продуктивний вихід інвазійної біомаси у штейнернем був набагато вищий, ніж у гетерорабдитисів. При розтині загиблих комах нематоди були виявлені переважно в головній частині.

Щодо ковалика посівного, то не було можливості порівняти інвазійну активність нематод різних родів, оскільки штейнернемами ковалики не заражались. При дозі зараження 300 нематод на 1 комаху міграція гетерорабдитид починалась на 3-6 день після загибелі і продовжувалась 1-2 тижні. Вихід інвазійних личинок гетерорабдитид був невисокий і становив для ізолятів *Heterorhabditis* F5 та A 20 2908 (8-110000) екз. Порівняно невеликий вихід інвазійного матеріалу, напевно, пояснюється наявністю стороннього бактеріального та грибкового ураження більшості личинок комах.

Щодо особливостей міграційної активності ентомопатогенних нематод з трупів діабротики та звичайного бурякового довгоносика інформація неоднозначна. Не зважаючи на те, що проти обох шкідників застосовували один і той же ізолят, а саме *Heterorhabditis* F5, вихід інвазійного матеріалу значно відрізнявся. З личинок діабротики середній вихід становив 5787,75 (600-10923) екз. нематод, а з личинок довгоносика він був майже в 6 разів вищим і досягав 36557,7 (1120-185760) екземплярів. Міграційна активність у обох видів комах розпочиналась на 4-7-й день після загибелі господаря та тривала до 4 тижнів.

Слід зазначити, що вихід інвазійних личинок нематод відмічався лише з 72,2 % трупів довгоносика, у решти комах міграції не спостерігалось, не зважаючи на наявність інфікування їх нематодами. І в цьому випадку ми вбачаємо вплив сторонньої грибової та бактеріальної інфекції. Відмічено, що інвазійні личинки нематод, що виходили зі всіх досліджуваних господарів, зберігали свої патогенні властивості. Вихід інвазійного матеріалу нематод з трупів комах набагато перевищував дозу ентомогельмінтів, що була застосована. А це дозволяє припустити, що ці ізоляти нематод зможуть не тільки відтворювати, а й навіть збільшувати свою кількість в природних умовах, що необхідно враховувати при проведенні заходів захисту з метою зменшення кількості обприскувань.

**Висновки.** З дев'яти видів комах чутливими до місцевих ізолятів ентомонематод виявились 6, стійкими – 3. Високу чутливість до певних ізолятів обох досліджуваних родів проявили воцинна міль, травневий хрущ та вовчок звичайний.

У ізоляту *Heterorhabditis* F5 зафіксована 100 % ефективність проти личинок діабротики та звичайного бурякового довгоносика.

Слабочутливими до гетерорабдитид виявились личинки ковалика посівного, а личинки ковалика буруногого, жука-носорога та імаго клопа-москаля ентомонематодами не заражались.

Щодо виходу інвазійних личинок з загиблих комах, то найвищі показники спостерігались у ізоляту *Steinernema* ZAK при зараженні імаго вовчка звичайного і у ізоляту *Heterorhabditis* F5 при зараженні личинок звичайного бурякового довгоносика.

Середні показники виходу інвазійних личинок склали відповідно 47950 та 36558 екземплярів з 1 комаху. Інвазійні личинки, що виходили зі всіх досліджуваних господарів, зберігали свої патогенні властивості.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Данилов Л.Г. Биологическое обоснование применения нематод *Neoplectana carposcapsae* для борьбы с вредными насекомыми : автореф. дис. на соискание научн. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.09 «Энтомология» / Л.Г. Данилов. – Л., 1978. – 24 с.

2. Deichmann M. Biotest zur Abschätzung des Kontrollpotentials entomophager Nematoden / M. Deichmann, R.-U. Ehlers, U. Wyss // Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirt. – Berlin-Dahlem, 1988. – №245. – P. 452.
3. Glaser I. Measures for evaluation of entomopathogenic nematode infectivity to insects / Itamar Glaser // 2<sup>nd</sup> Int. Nematol. Congr. (Veldhoven, 11-17 Aug., 1990). – Wageningen, 1990. – P. 81.
4. Caroli L. Entomopathogenic nematode infectivity assay: Comparison of penetration rate into different hosts / L. Caroli, I. Glaser, R. Gaugler // Biocontr. Sci. and Technol, 1996. – V.6. – №2. – P.227-233.
5. E. Tarasco. Confronto di patogenicità fra otto ceppi di *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) rinvenuti in terreni dell'Italia meridionale // Entomologica, 1997. – T.31. – P.171-179.
6. Bedding R. *Heterorhabditis* spp., *Neoplectana* spp. and *Steinernema kraussei* : interspecific and intarspecific differences in infectivity for insects / R. Bedding, A.S. Molyneux, R.J. Akhyst // Exp. Parasitol.– 1983.– V.55.– №2. P.249–257.
7. Steiner. Dispersal and host– finding ability of entomopathogenic nematodes at low temperatures / Steiner // Nematologica. – 1996.– 42. – № 2. – P. 243–261.
8. Hay D.B. The analysis of in vivo bioassay in entomopathogenic nematode research: A behavioural approach [4<sup>th</sup> Eur. Meet. Microb. Contr. Pests”(Zurich, 5–10 Sept., 1993) / D.B. Hay, J.S. Fenlon, P.N. Richardson // IOBS/WPRS Bulletin.– 1994.– V.17. – №3.– P. 136–139.
9. Методические указания по массовому разведению *Heterorhabditis bacteriophora* на вошинной моли / [Следзевская Е.Р., Сонин М.Д., Блинова С.Л., Ларченко Т.Т.] – М., 1987. – 13с.
10. White G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures / G.F. White // Science.– 1927. – №66. – P.302–303.

**Оценка инвазионной активности энтомопатогенных нематод *Steinernema* и *Heterorhabditis* относительно насекомых**

**Д.Д. Сигарёва, Т. А. Галаган, В. М. Довгеля, Н.В. Грацианова, В.В. Олененко, О.Я. Бокшан, Т.Н. Журавчак**

Исследованы инвазионные, миграционные и репродуктивные свойства местных изолятов энтомонематод родов *Steinernema* и *Heterorhabditis* по отношению к гусеницам галерии, имаго медведки обыкновенной и красноклопа; личинок западного майского жука, жука-носорога, свекловичного долгоносика, шелконов посевного и буруногого, а также диабротики.

**Ключевые слова:** энтомопатогенные нематоды, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, вошинная моль, медведка обыкновенная, красноклоп, западный майский жук, жук-носорог, свекловичный долгоносик, шелкоун посевной, шелкоун буруногий, диабротика, инвазионная активность, миграция, инвазионный выход.

**Research migratory activity of entomopathogenic nematodes *steinernema* and *heterorhabditis* genera against insects**

**D.Sigareva, T.Galagan, V.Dovgelya, N.Gratsianova, V.Olenenko, O.Bokshan, T. Zhuravchak**

Migratory, invasive and reproductive properties of local isolates of entomopathogenic nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis* genera against wax moth caterpillars, mole cricket and firebug imago, larvae of european cockchafer, rhinoceros beetle, beet weevil, click beetles *Agriotes sputator* L and *Melanotus brunnipes* Germ., and also of western corn rootworm are investigated.

**Key work:** entomopathogenic nematodes, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, wax moth caterpillars, european cockchafer, mole cricket, firebug, rhinoceros beetle, beet weevil, click beetles, *Agriotes sputator*. *Melanotus brunnipes* Germ, western corn rootworm, migration activity, invasive activity, reproduction potential.