

УДК 632.651

**Д.Д. СИГАРЁВА**, д-р биол. наук, профессор,  
научный сотрудник<sup>1</sup>

**В.В. ХАРЧЕНКО**  
аспирант<sup>1</sup>

**Н.А. ЧИГРИН**, канд. биол. наук,  
доцент кафедры ландшафтного проектирования<sup>2</sup>  
<sup>2</sup>Полесский государственный университет,  
г. Пинск, республика Беларусь

**Е.В. БОЛТОВСКАЯ**  
старший научный сотрудник<sup>1</sup>

**А.Н. КОВТУН**  
аспирант  
<sup>1</sup>Институт защиты растений НАН Украины,  
г. Киев, Украина

*Статья поступила 11 апреля 2018г.*

## **РАЗМНОЖЕНИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ НЕМАТОД РОДА *STEINERNEMA* НА ЛИЧИНКАХ МАЙСКОГО ЖУКА (*MELOLONTHA MELOLONTHA*) В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

*Проверена возможность использования майского жука (*Melolontha melolontha*) для массового размножения энтомопатогенных нематод (ЭПН) рода *Steinernema* в лабораторных условиях. Исследована миграционная активность и репродуктивный потенциал стейнернем на личинках майского жука.*

**Ключевые слова:** энтомопатогенные нематоды, насекомое-хозяин, выделение личинок, *Steinernema spp.*, *Entonem.*

**Введение.** Использование интегрированной системы защиты против вредителей, обитающих в почве, и других скрытноживущих имеет определенные трудности. В этом контексте внимание ученых привлекли биопрепараты нового поколения, которые создаются на основе энтомопатогенных нематод. Их популярность связана, в первую очередь, с экологической безопасностью и более низкой, в сравнении с другими биопестицидами, стоимостью производства [2, с. 967–969].

В настоящее время практика защиты растений во многих странах имеет значительное количество примеров успешного использования энтомопатогенных нематод для защиты от вредителей сельскохозяйственных культур. Эффективность биоинсектицидов на основе энтомопатогенных нематод в большинстве опытов была на уровне эффективности химических препаратов, причем, стоимость препаратов на основе энтомонематод в целом не превышает стоимости химических [1, с. 110]. Хотя затраты на обработку энтомонематодами ряда культур (например, садов, ягодников) выше, чем на обработку инсектицидами, первый вариант является более перспективным вследствие отсутствия токсичных остатков пестицидов и более длительного действия на вредные организмы.

Однако для успешного использования ЭПН нужно наработать методы их культивирования. На сегодня хорошо разработаны методы массового производства энтомопатогенных нематод как на личинках насекомых, так и на искусственных питательных средах.

Восковая моль (*Galleria mellonella*) считается лучшим насекомым–хозяином для размножения энтомопатогенных нематод *in vivo* [3, с. 300]. Культивирование ЭПН на ней производится для массового получения инвазионных личинок.

Выход биомассы инвазионных личинок и их миграционная активность зависят от дозы нематод и плотности их микропопуляций в процессе формирования первого поколения [4, с. 142–143]. При оптимальной плотности нематоды развиваются в одном поколении, миграция их из насекомого–хозяина происходит в короткий срок и более интенсивно; при плотности, превышающей оптимальную, нематоды развиваются в двух поколениях. Возраст и размеры насекомых также влияют на темпы размножения ЭПН. Есть наблюдения, позволяющие заключить, что выход инвазионных личинок повышается с увеличением дозы заражения и возраста гусениц. Наиболее высокие показатели выхода биомассы нематод, полученные при заражении гусениц галерии весом 100–120 мг и при дозе заражения 300 инвазионных личинок на 1 гусеницу.

В настоящее время почти все лабораторное и маломасштабное разведение энтомопатогенных нематод основано на использовании гусениц восковой моли, однако используются и другие насекомые–хозяева.

**Методика и объекты исследования.** В нашей работе в качестве насекомого–хозяина испытывались личинки майского жука (*Melolontha melolontha*).

Для проведения опытов по эффективности ЭПН требуется большое количество живых личинок или готовые промышленные препараты. Известно, что в Украине таких препаратов нет, но у нас была возможность испытывать голландский биологический препарат Энтонем на основе нематоды вида *Steinernema feltiae*.

Задачи исследования: определить возможность получения личинок ЭПН путем их размножения в лабораторных условиях на вредных тест–насекомых; сравнить производительность размножения местного изолята *Steinernema sp.* с известным видом *Steinernema feltiae*, которым представлен препарат Энтонем. Опыт включал 2 существующих способа выделения личинок ЭПН из зараженных насекомых: метод Орозко (2014 г) и метод Уайта (1924 г).

В опыте использовали личинки майского жука, одна половина из которых погибла от *Steinernema feltiae*, а другая половина – от местного изолята *Steinernema sp.* В каждом варианте заражения живых личинок нового поколения выделяли как методом Орозко (3 насекомых), так и методом Уайта (3 насекомых). Подсчет выделенных личинок проводили каждые 2–3 дня на протяжении полутора месяцев (начиная с размещения личинок жука) согласно двум методам выделения.

**Результаты и их обсуждение.** Как видно из приведенных данных, выделение личинок ЭПН из зараженных личинок майского жука началось на 2–12 день после их размещения в чашках Петри. При этом при использовании метода Уайта (увлажненная среда) выделение начиналось значительно раньше (на 2–5 день), в то время как по методу Орозко (сухая среда) этот процесс зафиксирован на 10–12 день. Эта закономерность отмечена как со *Steinernema sp.*, так и со *Steinernema feltiae*.

Выделение личинок ЭПН, которое началось на 2–12 день после гибели тест–насекомых, продолжалось от 49 до 55 дней (Таблица 1). Несколько дольше этот процесс продолжался у вида *Steinernema feltiae*, короче – у местного изолята *Steinernema sp.* (40–49 дней).

Относительно влияния метода выделения личинок (Орозко, Уайт) на длительность процесса выделения, полученные нами данные противоречивы. В одном случае (со *Steinernema sp.*) процесс длился 40 дней с применением метода Орозко и 49 дней с применением метода Уайта. В другом случае (со *Steinernema feltiae*) все было наоборот: по методу Орозко личинки выделялись 55 дней, по методу Уайта 49 дней.

В целом, несколько лучшие результаты отмечены для вида *Steinernema feltiae*, у которого от одной личинки майского жука было получено 110421 (53883–151768) личинок ЭПН. Для местного изолята *Steinernema sp.* эти показатели немного ниже, но также удовлетворительные (92369 (32666–134987) особей).

Таблица 1 – Размножение представителей рода *Steinernema* на личинках майского жука (*Melolontha melolontha*) в лабораторных условия

№ п/п	Изолят	Даты		Метод выделения	Начало выделения		Продолжительность выделения		Количество личинок, выделенных с одного насекомого
		заражения	гибели		Дата	Дней после гибели	Даты	Количество дней	
1	<i>Steinernema sp</i>	14.05	17.05	Орозко	26.05	10	26.05–05.07	40	69067 (32666–126993)
2		14.05	17.05	Уайта	22.05	8	22.05–10.07	49	115669 (95094–134987)
<b>Среднее</b>						<b>9</b>		<b>44,5</b>	<b>92369 (32666–134987)</b>
1	<i>Steinernema feltiae</i>	17.05	19.05	Орозко	28.05	9	28.05–10.07	55	121748 (91728–151768)
2		17.05	19.05	Уайта	22.05	3	22.06–10.07	49	99614 (53803–131344)
<b>Среднее</b>						<b>6</b>		<b>52</b>	<b>110481 (53803–151768)</b>

Количественные показатели влияния методов выделения на эффективность процесса выделения личинок ЭПН также противоречивы. В одном случае (местный изолят *Steinernema sp.*) методом Уайта выделилось почти вдвое больше личинок, чем по методу Орозко, а именно 115369 (95094–134987) против 69067 (32666–95997). В случае с популяцией *Steinernema feltiae* по методу Уайта зафиксировано 99814 (53803–131344) личинок, а по методу Орозко – 121748 (91728–151768).

Таким образом, процесс выделения личинок ЭПН из зараженных личинок майского жука продолжался от 40 до 55 дней. Но мы проводили учет личинок каждые 2–3 дня, поэтому целесообразно проанализировать эффективность процесса выделения от его начала и до конца.

Соответствующие данные, приведенные в таблице 2, показали, что основная масса личинок выделилась в средние 3 декады всего периода выхода, но наибольшая их численность (33,4–51,5%) выделилась во вторую декаду (с 01.06.2017 г. по 11.06.2017 г.). Достаточно большая численность личинок (24,6–39,1%) наблюдалась в третью декаду (с 13.06.2017 г. по 22.06.2017 г.). В четвертой декаде (с 27.06.2017 г. по 08.07.2017 г.) личинки еще продолжали интенсивно выделяться, однако в одном из вариантов она снизилась до 8,3% (возможно, повлиял примененный здесь метод Орозко).

Значительно меньшее количество составляли личинки, которые появились в чашках Петри в первую декаду (1,1–6,0%). Еще меньше их было в конце процесса выделения, в большинстве чашек Петри, выставленных по методу Орозко, личинок уже не было, а в некоторых – их численность не превышала 0,1%.

Таблица 2 – Динамика выделения личинок ЭПН при размножении на насекомых майского жука (*Melolontha melolontha*)

№ п/п	Изолят	Метод выделения	Дата		Количество выделенных нематод по дате учета					Всего
			заражения	начала выделения	22.05–30.05	01.06–11.06	13.06–24.06	27.06–08.07	10.07–14.07	
1	<i>Steinernema sp</i>	Орозко	14.05	26.05	1824	8304	22508	30	0	32666
2					222	5340	24856	17126	0	47544
3					175	93113	33592	112	0	126992
<b>Среднее</b>					<b>740</b>	<b>35586</b>	<b>26985</b>	<b>5756</b>	<b>0</b>	<b>69067</b>
<b>%</b>					<b>1,1</b>	<b>51,5</b>	<b>39,1</b>	<b>8,3</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
1	<i>Steinernema sp</i>	Уайта	14.05	22.05	5511	65664	20468	24968	316	116927
2					7076	43288	56444	27968	211	134987
3					6356	66060	8644	14035	9	95104
<b>Среднее</b>					<b>6314</b>	<b>58337</b>	<b>28519</b>	<b>22324</b>	<b>179</b>	<b>115673</b>
<b>%</b>					<b>5,5</b>	<b>50,4</b>	<b>24,6</b>	<b>19,3</b>	<b>0,2</b>	<b>100</b>
7	<i>Steinernema feltiae</i>	Орозко	17.05	28.05	0	23012	29976	38740	0	91728
8					7219	40515	31024	42063	162	120983
9					14768	58019	33272	45386	323	151768
<b>Среднее</b>					<b>7329</b>	<b>40515</b>	<b>31424</b>	<b>42063</b>	<b>162</b>	<b>121493</b>
<b>%</b>					<b>6,0</b>	<b>33,4</b>	<b>25,9</b>	<b>34,6</b>	<b>0,1</b>	<b>100</b>
10	<i>Steinernema feltiae</i>	Уайт	17.05	22.05	5359	51568	23616	31333	18	113694
11					3013	64224	23256	40542	309	131344
12					926	18384	30236	4257	0	53803
<b>Среднее</b>					<b>3099</b>	<b>44725</b>	<b>25703</b>	<b>25977</b>	<b>109</b>	<b>99614</b>
<b>%</b>					<b>3,1</b>	<b>44,9</b>	<b>25,8</b>	<b>26,1</b>	<b>0,1</b>	<b>100</b>

Следовательно, при культивировании ЭПН на личинках майского жука все заново образованные личинки успевают выйти наружу за 40–55 дней. Наиболее активный выход личинок (24,6–51,5%) наблюдался в период второй–четвертой декад. В первой декаде процесс выхода личинок только начинался, и количество их по вариантам исследований не превышало 1,1–6,0%. В последнюю (пятую) декаду в большинстве случаев выход личинок уже прекратился, а если и продолжался, то количество личинок было незначительным.

**Выводы.** При размножении ЭПН на личинках майского жука целесообразно использовать метод Уайта, при котором выход личинок энтомонематод с трупа насекомого–хозяина начинается на 2–5 день, в то время как по методу Орозко – на 10–12 день.

Процесс выделения личинок ЭПН длился от 40 до 55 дней. Он был несколько длительнее у *Steinernema feltiae* (49–55 дней), короче – у местного изолята *Steinernema sp.* (40–49 дней).

Всего за указанный период из одной личинки майского жука, зараженного *Steinernema feltiae*, получено 110 421 (53803–151768) инвазионных личинок нематод, при заражении местным изолятом *Steinernema sp.* показатель несколько ниже, но также удовлетворительный – 92369 (32666–134987) особей.

Относительно производительности различных периодов выделения можно утверждать, что лучшие показатели получены в течение 2–4 декад. Больше всего личинок выделилось во 2 декаду (33–51%), достаточно много их выделилось в течение 3 декады (25,8–39,1%). В первой декаде вышли от 1,1 до 6,1% личинок. В последнюю декаду выход личинок прекратился.

### Список литературы

1. Kaya, K.H. The nematodes, *Neoaplectana carpocapsae* and *Heterorhabdus* spp., in biological control of insect pests / K.H. Kaya // Invertebrate Pathology and Microbial Control Proceeding. III rd Internat. Colloquium on Invertebrate Pathology. – 1982. – P. 107–112
2. Nickle, W.R. Manual of Agricultural Nematology / W.R. Nickle. – New York: Marcel Dekker, 1991. – 1035 p.
3. Woodring, J.L. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: a handbook of biology and techniques / J.L. Woodring, H.K. Kaya. – Fayetteville, Ark. : Arkansas Agricultural Experiment Station, 1988. – 331 p.
4. Сигарева, Д.Д. Оценка инвазионной активности энтомопатогенных нематод *Steinernema* и *Heterorhabditis* относительно насекомых / Д.Д. Сигарева [и др.] // Агробиологія – 2012. – № 8. – С. 140–145

**SIGAREVA Dina D.**

**KHARCHENKO Valentine V.**

**TSCHIGRIN Natalia A.**

**BOLTOVSKA Elena V.**

**KOVTUN Andrei N.**

### **REPRODUCTION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES OF THE GENUS STEINERNEMA IN THE LARVAE OF THE MAY BEETLE (*MELOLONTHA MELOLONTHA*) IN THE LABORATORY**

*Verified the possibility of use of the tree-beetle (*Melolontha melolontha*) for mass reproduction entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema* in the laboratory. Migration activity and reproductive potential of the *Steinernema* on the larvae of the tree-beetle were studied.*

**Key words:** entomopathogenic nematodes, host insect, larva isolation, *Steinernema* sp., *Entonem*.

### References

1. Kaya K.H. The nematodes, *Neoaplectana carpocapsae* and *Heterorhabdus* spp., in biological control of insect pests . Invertebrate Pathology and Microbial Control Proceeding. III rd Internat. Colloquium on Invertebrate Pathology, 1982, pp. 107–112.
2. Nickle W. R. Manual of Agricultural Nematology. New York, Marcel Dekker, 1991, 1035 p.
3. Woodring J.L., Kaya K.H. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: a handbook of biology and techniques. Fayetteville, Ark., Arkansas Agricultural Experiment Station, 1988, 331 p.
4. Sigareva D.D, Galagan T.A., Dovgelya V.M., Gratsianova N.V., Olenenko V.V., Bokshan O.Ya., Zhuravchak T.M. Otsenka invazionnoy aktivnosti entomopatogennykh nematod *Steinernema* i *Heterorhabditis* otноситel'no nasekomykh [Research migratory activity of entomopathogenic nematodes *steinernema* and *heterorhabditis* genera against insects]. *Agrobiologiya* [Agrobiology], 2012, no. 8, pp. 140–145 (in Ukraine)

*Received 11 April 2018*