

ОСОБЕННОСТИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ НЕМАТОД (NEMATODA – STEINERNEMATIDAE), ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ В ТЕПЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ УЗБЕКИСТАНА

У. Э. НОРБОВА

Сурхандарьинская область, Деновский институт
предпринимательства и педагогики, Узбекистан

АННОТАЦИЯ

В статье приводятся впервые полученные исследователем в Узбекистане данные, по выделенным из природы полезным местным нематодам *Steinernema carposcaphae*, *Steinernema feltiae*, *Steinernema* spp, вида *Heterorhabdis* бактериофора. Проведен морфологический и морфометрический анализ их. Определены параметры воздействия и особенности реагирования на различные условия окружающей среды (температуру, влажность, pH) видов *Steinernema feltiae* в лабораторных условиях.

Introduction

Нематоды (класс Nematoda) обитают на нашей планете почти повсеместно. В процессе эволюции многие, первично свободноживущие нематоды превратились в паразитов животных и растений. Особое место среди них занимают т.н. энтомопатогенные нематоды, относящиеся к двум семействам отряда Rhabditida: штейнернематиды (сем. Steinernematidae) и гетерорабдитиды (сем. Heterorhabditidae). Их личинки проникают в полость тела различных насекомых, где и развиваются до взрослых особей, порождающих следующее поколение.

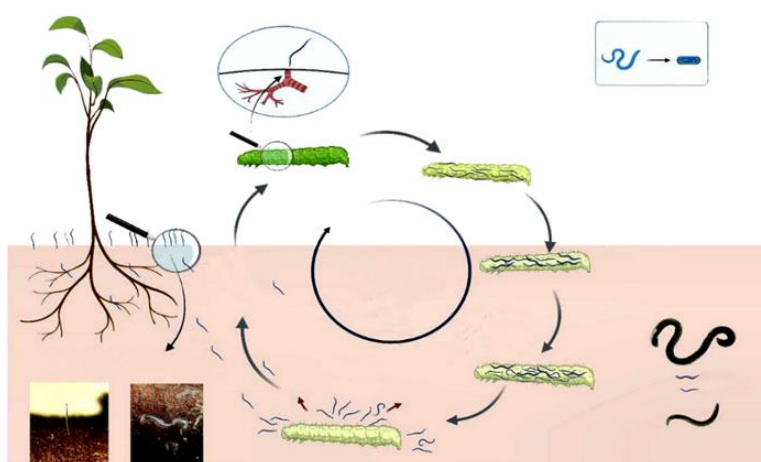


Рис.1. Жизненный цикл энтомопатогенных нематод

Представители этих двух семейств находятся в симбиотической связи с бактериями двух разных родов: *Xenorhabdus* и *Photorhabdus* (соответственно), размножение которых в полости тела насекомого и является непосредственной причиной гибели насекомых. Само существование энтомопатогенных нематод было научно описано лишь в XX веке, хотя довольно точные описания их находок приводились натуралистами и в XIX веке

(Мечников, 1879). Их первые научные описания связаны с именем Г.Штейнера, который описал два (валидных и по сей день) вида из Германии (Steiner, 1923) и США (Steiner, 1929).

Первое описание энтомопатогенной нематоды из России принадлежит Ивану Николаевичу Филипьеву (Filipjev, 1934), заложившему основы исследований по ним в нашей стране. Описанная им *Steinernema* (syn. *Neoaplectana*) *feltiae* оказалась самой распространенной энтомопатогенной нематодой на Земле и эффективным регулятором численности почвенных насекомых. Понимание тонких биологических механизмов их существования пришло позднее. В 30-е годы XX века Проспер Бовьен (Bovien, 1937) первым заметил присутствие палочковидных бактерий в инвазионных личинках штейнернематид, но лишь Джордж Пойнар Младший и его сотрудники доказали особую важность бактерий в жизнедеятельности энтомопатогенных нематод (Poinar G.O., 1990). Было показано, что бактерии обеспечивают гибель насекомого после проникновения в него личинок биоагента, обеспечивающего трансформацию содержимого хозяина в питательный субстрат и защиту развивающегося очага нематод от других компонентов почвенной биоты. Они оказались довольно разнообразными, каждый год описываются их новые виды. И всё же многие стороны функционирования этой симбиотической системы остаются не изученными. Недостаточной остается и исследованность этих организмов на территории Российской Федерации (Н.С.Шепелёва, 2011).

Главной биологической особенностью нематод семейства *Steinernematidae* является симбиотическая связь с патогенными бактериями родов *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Flavobacterium*. Последние – обязательные обитатели их пищеварительного тракта, так как являются для них единственной усвояемой и полноценной пищей на всех стадиях развития. Но, с другой стороны, эти же бактерии известны как способные вызвать септицемию у насекомых, то есть бурное развитие в полости тела инфекции, распространяющейся во все органы и ткани, от которой насекомые погибают.

Энтомопатогенная нематода – уникальный биоагент в сфере защиты растений.

Борьба с вредителями сельскохозяйственных культур является одной из глобальных проблем современного пищевого производства. В связи с этим важно разработать контрмеры, защищая экологическую среду и здоровье почвы. Использование энтомопатогенно-полезных нематод в качестве агентов биологической борьбы применяемой в мировом опыте имеет высокую эффективность. Полезные нематоды естественным образом встречаются в почве и используются для борьбы с насекомыми-вредителями и их личинками. Они проникают в своих хозяев через рот, задний проход или дыхательные отверстия и питаются ими. Это приводит к появлению специфических бактерий из кишечного тракта агента. Эти бактерии покидая полость тела нематод, распространяются внутри насекомых и очень быстро размножаются. Бактерии превращают ткани насекомых в пищу, которая легко усваивается биоагентом и насекомые умирают в течение нескольких дней. Полезные нематоды могут быть использованы для биологической борьбы более чем с 200 насекомыми-вредителями, принадлежащими к 100 родам, обитающим в почве и проходящим в ней личиночную стадию. Они

распространены по всему миру, но их видовое биоразнообразие и распространение в некоторых странах и регионах до сих пор плохо изучены (Adams и др., 2006).



Рис.2. Процесс нематологических исследований в лабораторных условиях

В частности, до сих пор не предоставлена информация о научных исследованиях, связанных с энтомопатогенными нематодами в Узбекистане. Это доказывает, что изучение этих полезных организмов и разработка технологий их использования в качестве объектов биологического контроля актуальны. Целью данного исследования являлось выявление местных энтомопатогенных нематод, распространенных на территории Узбекистана и публикация предварительной информации о них. Путем внедрения биологически безопасных средств и методов не оказывающих отрицательного воздействия на окружающую среду, здоровье человека и полезных энтомофагов, наша Республика стремится совершенствовать их для экологически чистого выращивания сельскохозяйственной продукции и развития органического земледелия.

Впервые в Центральной Азии с целью создания технологии массового разведения и применения новых видов энтомопатогенов, выделены из природы полезные местные нематоды *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, *Steinernema spp*, виды *Heterorhabdis* бактериофора. Проведены научно-исследовательские работы по разведению этих энтомопатогенов в лабораторных условиях в Научно-исследовательском институте по карантину и защите растений Республики Узбекистан. Проведены исследования по созданию биологических препаратов на основе местных энтомопатогенных нематод, разработан и выигран инновационный прикладной проект.

Докторант 2-курса Деновского института предпринимательства и педагогики в Сурхандарьинской области провела исследования по выявлению энтомопатогенных нематод, встречающихся в тепличных условиях ООО «GOLD AGRO FRESH» Термезского района, где выращивались огурцы сорта «Неймар».

Из верхнего слоя почвы 10-30 см, тепличного хозяйства, отбирали по пять образцов с каждого участка (общ.-1 кг).



Рис.3. Тепличное хозяйство ООО «GOLD AGRO FRESH», Сурхандарьинская область, Термезский район, огурцы сорта «Неймар».

Образцы хранили в полиэтиленовых пакетах в холодильнике до момента экстракции. Энтомопатогенные нематоды были выделены из образцов почвы с использованием «метода иннокуляции насекомых», представленного Akhurst и Bedding. В качестве хозяина использовалась восковая моль — *Galleria mellonella* (Linnaeus). В ходе эксперимента образцы почвы очищали от лишних камней, палочек, корней и других объектов, увлажняли, взвешивали на весах по 250 г и помещали в пластиковые контейнеры. Затем на образец помещали десять-двадцать личинок восковой моли и выдерживали в термостате ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) в течение 1 недели.



Рис.4. Выделение энтомопатогенной нематоды методом иннокуляции насекомых (Bedding и Akhurst).

Пробы почвы проверялись каждые два дня, мертвые личинки собирались и помещались в «белые ловушки», для изоляции их на инфекционной стадии. Свежих гусениц восковой моли использовали для проверки патогенности выделенных энтомопатогенных нематод и

создания новых культур. Для идентификации имеющихся энтомопатогенных нематод, на предметное стекло, наносили раствор Ringer. С помощью лабораторного микробиологического тринокуляра (N 307) провели морфологический и морфометрический анализ. Идентификация видов, принадлежащих к родам *Steinernema* или *Heterorhabditis*, сложна и многогранна, требует одновременной морфометрии и анализа ДНК.

Морфометрический анализ основан на длине и ширине тела, а также на специфических анатомических особенностях нематоды.

Двадцать особей каждой стадии жизни (самцы, самки и инфицированная молодежь) были исследованы живыми для наблюдения и оценки под световым микроскопом. Кроме того, образцы умерщвляли и фиксировали в ТАФ (7 мл формалина, 2 мл триэтаноламина, 91 мл воды) (Kaya and Stock 1997). Морфологические признаки и морфометрические измерения наблюдали под световым микроскопом с программным обеспечением (optica proview, Италия) с использованием объективов 4X, 10X и 40X.

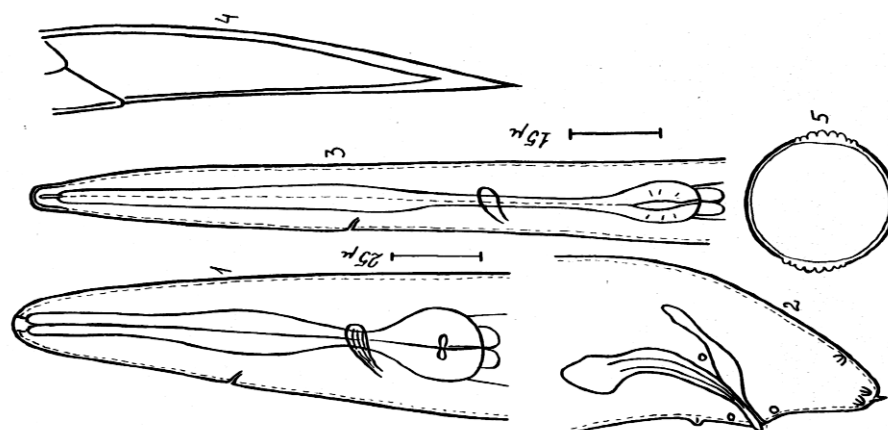


Рис.5. Схематическая и микроскопическая иллюстрация энтомопатогенной нематоды *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934)

1,2 – передний и задний конец тела самца первого поколения;

3,4 – передний и задний конец тела инвазионной личинки;

5 – боковая часть (lateral) тела инвазионной личинки

При дальнейших исследованиях оценки влияния параметров окружающей среды на виды *Steinernema Feltiae* в лабораторных условиях были получены результаты, представленные в таблице №1. Из них видно как нематоды реагируют на различные условия окружающей среды (температуру, влажность, pH).

В зависимости от температуры (°C) среды обитания 25°C, 20°C и 30°C определялась чувствительность нематоды к ней. В результате при 25°C они имели наибольшее время выживания (12 сут), наибольший уровень активности (95%) и уровень паразитизма (90%). Влажность (%) была представлена 80%, 70% и 90%. Этот параметр важен для определения того, как нематоды адаптируются к влаге. При самой высокой влажности

(90%) время их выживания составило (8 дней), а также снижается их активность и паразитизм.

Влажность (%) была представлена 80%, 70% и 90%. Этот параметр важен для определения того, как нематоды адаптируются к влаге. При самой высокой влажности (90%) время их выживания составило (8 дней), а также снижается их активность и паразитизм.

Уровень pH указанный в таблице, составлял 6,5, 7,0 и 6,0. На наш взгляд он влиял на биологическую активность нематод, что напрямую влияет на время их выживания и уровень паразитизма.

При определении количества опасного вещества (мг/л), вырабатываемого бактериями в нематоде было показано влияние на активность и время выживания нематод. Самая низкая концентрация (0,05 мг/л) имела наименьший эффект, а более высокие концентрации (0,1 и 0,15 мг/л) позволяют увеличить их активность и время выживания.

Таблица №1

Таблица оценки экологических характеристик *Steinernema Feltiae* в лабораторных условиях

Температура	°С	25	20	30
Влажность	%	80	70	90
Уровень pH	-	6,5	7,0	6,0
Продолжительность жизнеспособности	день	12	10	8
Уровень активности	%	95	85	75
Степень паразитизма	%	90	80	70
Количество опасного вещества	mg/L	0,1	0,15	0,05

Использованная литература

1. Шепелёва Н.С. //“Изучение симбиоза энтомопатогенных нематод и ассоциированных с ними бактерий: биологическое разнообразие и специфичность взаимоотношений” Автореф., 03.02.2011.
2. Akhurst, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes, *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121, 303-309 (1980).
3. Bovien P. Some types of association between nematodes and insects // Videnskabelige Meddeleser Fra Dansk Naturhistorisk Forening Kobenhaven. -1937. -№ 101. - P. 1-114 p.
4. Poinar G.O. Taxonomy and biology of Shteinerneimatidae and Heterorhabditidae. // Entomopathogenic nematodes in biological control. - Eds.: R. Gaugler and H.K. Kaya. - Boca Ration, FL: CRC Press. - 1990. - P. 23-61.
5. Stock S.P., Choo H.Y., Kaya H.K. An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species // Nematologica. - 1997. - Vol. 43. - P. 15-29.
6. Filipjev I.N. The classification of the free living nematodes and their relation to parasitic nematodes // Smithsonian miscellaneous collections. - 1934. -Vol. 89. - P. 1-63.

7. Steiner G. *Aplectana kraussei* n. sp., eine in der Blattwespe *Lyda* sp. Parasitierende Nematodenform, nebst Bemerkungen über das Seitenorgan der parasitischen Nematoden // Zbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskrank. - 1923. Hyg. Abt. 2, 59.-P. 14-18.
8. Steiner G. *Neopleetana glaseri* n. g., n. sp. (Oxyuridae) a new nemtic parasite of the Japanese beetle // Journal of the Washington Academy of Sciences. - 1929.-Vol 19.-P. 436-440.