

УДК 632.937.01:576.895

## ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ИНВАЗИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ НЕМАТОД (NEMATODA: STEINERNEMATIDAE) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ БИОТИЧЕСКИХ И АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

**Л.Г. Данилов**

*Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург*

На примере двух видов нематод семейства *Steinernematidae* приведена сравнительная оценка особенностей проявления их инвазионной активности, основанная на математическом моделировании зависимости интенсивности инвазирования и смертности насекомых-хозяев от условий заражения (температура, доза заражения, продолжительность периода свободного контакта). Нематоды *Steinernema feltiae protense* обеспечивают более высокий уровень смертности в широком диапазоне температур (от 6 до 28 °С), тогда как у *Steinernema carpocapsae* штамм «*agriotos*» этот диапазон лежит в пределах от 20 до 28 °С, что свидетельствует и о большей перспективности использования *S. feltiae protense* в качестве биологического агента по сравнению с *S. carpocapsae*.

**Ключевые слова:** энтомопатогенные нематоды, Steinernematidae, инвазионная активность, инвазионные личинки.

Энтомопатогенные нематоды (ЭПН) семейства Steinernematidae являются важными агентами для биологического контроля насекомых в природных и управляемых экосистемах [Denno et al., 2008; Lacey, Georgis, 2012]. Успех использования ЭПН в качестве биологических агентов против вредных насекомых во многом зависит от характера взаимоотношений их с хозяином в период поиска и контакта с ним. Жизненный цикл этих нематод протекает в организме насекомого-хозяина, вне его эти паразиты могут находиться только на стадии инвазионной личинки, которая является носителем генетического потенциала, обеспечивающего дальнейшее существование популяций отдельных видов нематод в среде их обитания. Кроме того, на основе инвазионных личинок изготавливаются биологические препараты, эффективность которых определяется качеством действующего компонента, проявляющего свои возможности в изменяющихся условиях окружающей среды. В литературе неоднократно появляются сообщения, где в качестве приоритетных ставятся задачи изучения особенностей экологии энтомопатогенных нематод и характера воздействия различных абиотических

и биотических факторов среды обитания на проявление жизнедеятельности инвазионных личинок [Gaugler et al., 1996; Liu et al., 2000; Shapiro-Ilan et al., 2014].

На эффективность заражения насекомых нематодами влияет качество нематодной культуры, т.е. инвазионная активность нематод, которая изменяется в зависимости от ряда обстоятельств: вида нематод, срока хранения культуры, культивирования как на искусственных питательных средах, так и на насекомых, температурных условий и т.д. [Данилов, Турицин, 2016].

По всей видимости, существует широкий спектр реакций по видам и штаммам ЭПН на воздействие окружающей среды [Morton, García-del-Pino, 2009; Salame et al., 2010]. Культуры различных видов нематод различаются не только по интенсивности гибели насекомых в процессе заражения, но и по активности проникновения инвазионных личинок в гемоцель хозяина [Веремчук, Данилов, 1976]. В полевых условиях в почве и на листовой поверхности температуры подвержены большим колебаниям, поэтому успешность использования нематод против целевых объектов будет во многом определяться знаниями закономер-

ностей поведения инвазионной стадии нематод в изменяющихся температурных условиях окружающей среды.

С этой целью нами были проведены исследования по

изучению поведения энтомопатогенных нематод, встречающихся в естественных условиях различных географических зон в присутствии насекомых-хозяев.

### Материалы и методы исследований.

Для сравнительной оценки в модельном опыте были использованы в качестве тест-насекомых гусеницы большой вошинной моли (*Galleria mellonella*) и две культуры нематод, показавшие наибольшие поведенческие различия по результатам испытаний их на гусеницах смородиновой стеклянницы [Данилов и др. 2011] – *Steinernema carpocapsae* штамм “*agriotos*” [Пойнар, Веремчук, 1970] и *Steinernema feltiae protense* [Иванова, Данилов, Ивахненко, 2001] – выделен из почв аласов Республики Саха (Якутия). На основе первого вида в нашей стране зарегистрирован препарат немабакт, на основе второго вида Государственную регистрацию проходит новый биологический препарат протонем. Нематод культивировали в гусеницах большой вошинной моли, культуры инвазионных личинок хранили 10 дней до начала опыта при температуре 2–5 °С. Оценку инвазионной активности нематод про-

водили по методу Веремчук и Данилова [1978], при этом виды нематод испытывали в 3 дозах: 10, 50 и 90 личинок на чашку Петри. В контроле вносили на фильтры воду без нематод. Все варианты опыта и контроль имели 5-кратную повторность.

Изменения инвазионной активности нематод оценивали по эффективности заражения насекомых при температурах от 10 до 30 °С. Гибель насекомых учитывали через каждые 4 часа после начала заражения. Во время учётов погибших насекомых выбирали из чашек, вскрывали в воде на часовом стекле под биноклем МБС-10 и определяли причину их гибели. Обнаруженных нематод подсчитывали и, таким образом, устанавливали интенсивность их проникновения в хозяина.

Линеаризацию зависимости доза – эффект проводили по алгоритму симметризации [Васильев и др., 1973].

### Результаты и обсуждение.

Для более точного определения оптимальных доз нематод при заражении насекомых, в целях достижения эффективности их применения в борьбе с вредителями, необходимо выявить и оценить зависимость смертности вредителя от применяемой дозы нематод в процессе его

заражения при разных температурах. В таблице 1 приведены результаты опытов по оценке смертности *G.mellonella* при трёх дозах нематод в расчёте на 10 насекомых (10, 50, 90) и разных температурах почвы.

Таблица 1. Смертность *G.mellonella* (процент погибших) при разных температурах и дозах для двух видов нематод

Температура (Т)	Доза нематод на чашку Петри (D)	<i>Steinernema feltiae protense</i>				<i>Steinernema carpocapsae</i>			
		Повторности				Повторности			
		1	2	3	4	1	2	3	4
6°	10	20	20	20	20	–	–	–	–
	50	50	50	40	40	–	–	–	–
	90	70	50	80	60	–	–	–	–
9°	10	30	30	30	30	–	–	–	–
	50	40	40	40	40	–	–	–	–
	90	70	60	70	60	–	–	–	–
12°	10	20	20	20	20	20	20	10	10
	50	60	70	90	80	20	30	30	60
	90	100	100	100	100	30	50	50	60
20°	10	50	60	40	70	20	10	30	20
	50	50	70	90	90	40	60	50	40
	90	90	100	90	100	40	60	80	70
28°	10	10	10	10	10	20	20	10	10
	50	20	30	20	20	90	60	80	70
	90	40	30	50	70	90	90	70	100

Наиболее важные моменты дисперсионного анализа приведены в таблице 2, которые показывают, что и температура и доза инвазионных личинок при заражении насе-

комых, также как и взаимодействие этих факторов оказывали существенное и статистически значимое влияние на уровень смертности насекомых.

Таблица 2. Сила влияния (коэффициенты детерминации) температуры и дозы инвазионных личинок в процессе заражения на уровень смертности *G. mellonella*

Вид нематод	Температура	Доза нематод при заражении насекомых	Взаимодействие температуры и дозы	Суммарное влияние факторов
<i>S. feltiae protense</i>	36.8	47.5	7.6	91.9
<i>S. carpocapsae</i>	16.5	59.5	9.1	85.1

Чётко выделяется зона температур максимальной инвазионной активности *S.feltiae protense* (12–23 °С). Характерно резкое падение смертности для этого вида нематод при заражении насекомых при температуре выше 20° (рис. 1).

Также характерно, что уровень смертности тест-насекомых при заражении их нематодами *S.feltiae protense* в пределах температур 6 и 9 °С относительно высок (43–45%) (рис. 2).

Статистически значимых различий в уровне смертности при этих температурах не установлено.

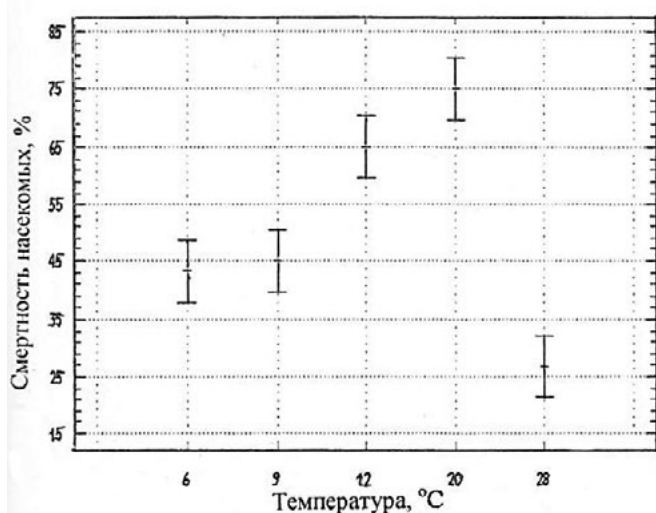


Рисунок 1. Зависимость уровня смертности *G. mellonella* от заражения *S. feltiae protense* при разных температурах (Средние значения и их 95% доверительные интервалы)

На рисунках 3 и 4 приведены аналогичные данные по интенсивности гибели гусениц большой вошинной моли при заражении их нематодами *S. carpocapsae* в зависимости от температуры. Максимальный уровень смертности насекомых здесь отмечается только при температуре 28 °C. Во всех случаях отмечены статистически значимые различия в уровнях смертности *G. mellonella*.

Сравнительный анализ рисунков 2 и 4 показывает, что уровень смертности *G. mellonella* при заражении *S. feltiae protense* заметно выше, нежели таковой у *S. carpocapsae* и это различие наблюдается при всех дозах заражения. При этом достаточно хорошо прослеживается, что нематоды *S. feltiae protense* обеспечивают более высокий уровень смертности в широком диапазоне температур (от 6 до 28 °C), тогда как у *S. carpocapsae* этот диапазон лежит в пределах от 20 до 28 °C.

По экспериментальным данным были построены математические модели зависимости уровня смертности насекомых от температуры и дозы нематод, используемой при заражении хозяина.

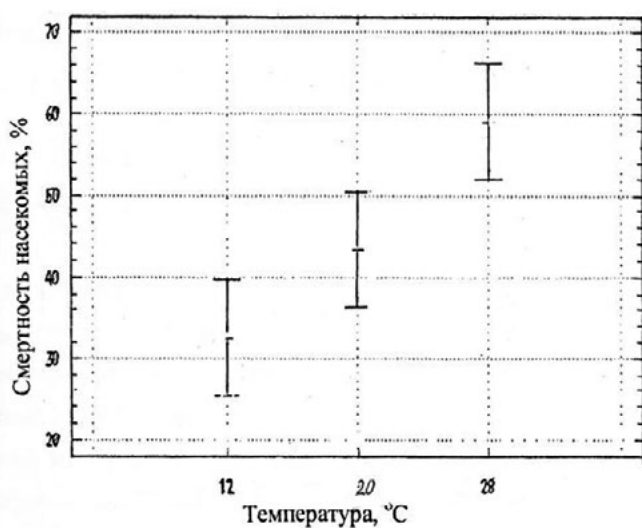


Рисунок 3. Зависимость уровня смертности *G. mellonella* от заражения *S. carpocapsae* при разных температурах (Средние значения и их 95% доверительные интервалы)

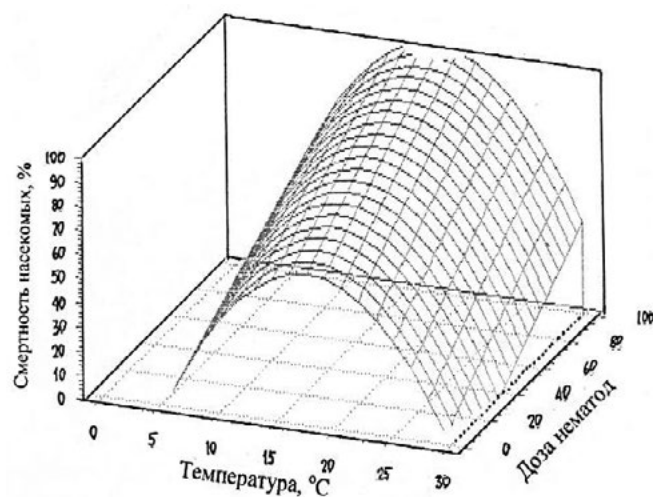


Рисунок 2. Трехмерный график зависимости уровня смертности *G. mellonella* от температуры и дозы внесения *S. feltiae protense*

Для *S. feltiae protense* модель имеет вид:

$$y_1 = -61 + 13.57T + 0.429D + 0.008TD - 0.412T^2 - 0.0004D^2 + 12,$$

где  $y_1$  – средний уровень смертности насекомых,  $T$  – температура,  $D$  – доза нематод при заражении насекомых.

Множественный коэффициент корреляции для этой модели  $R = 0.86$ , а коэффициент детерминации  $R^2 = 79.4\%$ ,  $F$ - критерий = 51, и  $P_0 < 0.00001$ .

Для *S. carpocapsae* модель имеет вид:

$$y_2 = -50 + 6.13T + 0.273D + 0.0415TD - 0.149T^2 - 0.0053D^2 + 9.$$

Множественный коэффициент корреляции  $R = 0.91$ , а коэффициент детерминации  $R^2 = 83\%$ ,  $F$ - критерий = 40, и  $P_0 < 0.00001$ .

Экспериментальные данные могут быть проиллюстрированы таблицей 3, в которой приведены температуры и дозы внесения нематод, используемые при заражении насекомых, при которых обеспечивается 50% гибель *G. mellonella*.

Таким образом, сравнительная оценка нематодных культур по их инвазионной активности и вирулентности для насекомых - хозяев, продемонстрированная на примере сравнения по этим показателям нематод *S. carpocapsae*

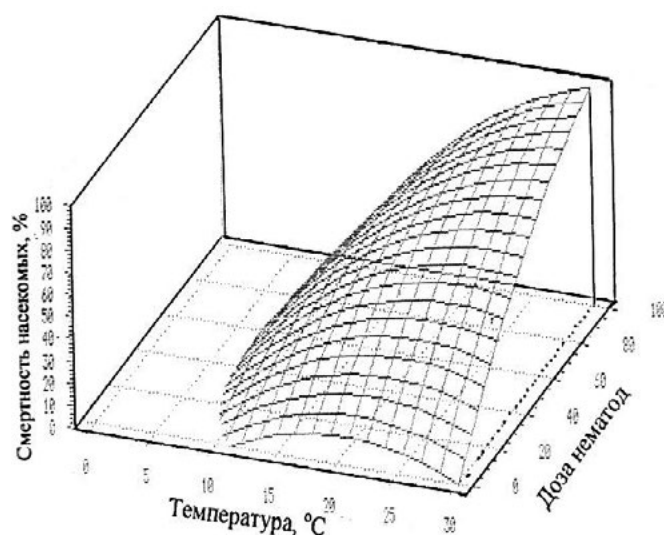


Рисунок 4. Трехмерный график зависимости уровня смертности *G. mellonella* от температуры и дозы внесения *S. carpocapsae*

Таблица 3. Температуры и дозы нематод, используемые при заражении *G. mellonella* и обеспечивающие  $LD_{50}$  для *S. feltiae protense* и *S. carpocapsae*

Температура	Доза нематод	
	<i>S. feltiae protense</i>	<i>S. carpocapsae</i>
6	100	–
8	65	–
10	30	–
12	10	–
15	10	–
17	10	60
20	10	45
25	50	35
27	80	35
28	95	40

штамм “*agriotos*” и *S. feltiae protense* позволяет установить различия между ними. Количество инвазионных личинок, проникающих в гемоцель насекомого определяется их численностью в зоне обитания хозяина. У *S. feltiae protense* абсолютное количество проникших в насекомых особей нематод на 96% зависит в равной степени от температуры и дозы нематод и от взаимодействия этих факторов, тогда как у *S. carpocapsae* абсолютное количество проникших особей лишь на 83% определяется этими двумя факторами, причём преобладающее значение имеет доза нематод.

Начальный период смертности насекомых и её продолжительность при заражении каждым видом нематод не за-

висят от дозы инвазионных личинок и определяются только температурными условиями. При заражении *S. feltiae protense* смертность насекомых на 79% определяется абсолютным количеством инвазировавших насекомых нематод и лишь на 10% зависит от температуры, а у *S. carpocapsae* смертность насекомых на 51% определяется абсолютным количеством проникших в тело насекомых нематод и на 42% температурой, т.е. смертность хозяина в большей мере зависит от температуры.

Максимальный уровень смертности при заражении насекомых *S. feltiae protense* проявляется при температуре от 12 до 23 °С и резко снижается при температуре выше 20°, тогда как у *S. carpocapsae* при испытанных дозах заражения отмечается только при 28 °С.

Эффективность заражения насекомых нематодами *S. feltiae protense* заметно выше, чем *S. carpocapsae*. В процессе заражения в одной чашке Петри 10 насекомых 50%-ную их смертность могут вызывать минимум 9 инвазионных личинок *S. feltiae protense* проникших в тело своей жертвы и это наблюдается в широком интервале температур (от 6 до 28 °С). Для *S. carpocapsae* 50%-ную смертность насекомых могут вызвать минимум 13 инвазионных личинок, проникших в гемоцель зараженных насекомых и в диапазоне температуры от 12 до 28 °С. Для первого вида проникновение 9 особей в тест-насекомых отмечается иногда при дозе 10, т.е. при соотношении нематод и насекомых 1:1, а проникновение в насекомых 13 инвазионных личинок у *S. carpocapsae* отмечается при дозе заражения не менее 50.

### Заключение.

Полученные экспериментальные данные показывают, что способность к заражению хозяина у видов нематод изменяется в разной степени с изменением температуры. Нематоды *S. feltiae protense*, встречающиеся в почвах аласов Республики Якутия более приспособлены к существованию при температурах, близких к нижнему порогу проявления активной жизнедеятельности штейнернематид.

У инвазионных личинок гетерорабдитид способность к инвазированию насекомого-хозяина также проявляется в большей степени при температурах выше 20 °С. Аналогичную особенность биологии гетерорабдитид – проявлять большую активность заражения насекомых при высоких температурах отмечали ранее и другие исследователи [Milstead, 1981]. О существовании определенной зависимости между инвазионной активностью нематод при различных температурах и встречаемостью этих паразитов в естественных условиях свидетельствуют и результаты нашего изучения территориального распространения нематод в различных географических зонах и прежде всего, полученные данные подтверждают нашу гипотезу о влиянии температуры на специфику зонального распространения видов энтомопатогенных нематод [Данилов, 2005].

Таким образом, *S. feltiae protense* характеризуется не только лучшими показателями по инвазионной активно-

сти, но и большей вирулентностью в отношении насекомого, которая к тому же проявляется в более широком диапазоне температур от 6 до 28 °С. Указанные различия у двух видов нематод свидетельствуют и о большей биологической эффективности и перспективности *S. feltiae protense* по сравнению с *S. carpocapsae*.

Установленная экспериментально прямая зависимость между количеством инвазионных личинок, находящихся в зоне обитания насекомого, и количеством нематод, проникающих в организм хозяина свидетельствует о возможности управления этим процессом, а следовательно и использования его для решения многих вопросов, связанных с изучением особенностей биологии энтомопатогенных нематод.

Результаты исследований являются основой для разработки оригинального метода сравнительной оценки нематодных культур штейнернематид, основанной на математическом моделировании зависимости интенсивности инвазирования и смертности насекомых-хозяев от условий заражения (температура, доза заражения, продолжительность периода свободного контакта), продемонстрированной на примере сравнения по этим показателям нематод *S. carpocapsae* штамм “*agriotos*” и *S. feltiae protense*.

### Библиографический список (References)

Васильев С.В., Поляков И.Я., Сергеев Г.Е. Теория и методы использования математического моделирования и ЭВМ в защите растений // Тр. ВИЗР. 1973. В. 39. С. 61–106.  
 Веремчук Г.В., Данилов Л.Г. Об определении инвазионной активности *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae) // Тез. докл. Всес.

научн. конф. Микробиологические методы борьбы. Кишинев, 1976. С. 132–134.  
 Веремчук Г.В., Данилов Л.Г. Методические указания по оценке инвазионной активности нематодных культур рода *Neoplectana* (Steinernematidae) // Ленинград, 1978. 11 с.

- Данилов Л.Г., Павлюшин В.А., Нашекина Т.Ю., Айрапетян В.Г. Новый природный изолят энтомопатогенных нематод активных при низких температурах. *Materiały VII Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Perspektywiczne opracowania są nauką i technikami - 2011»* V. 42. *Nauk biologicznych: Przemysł. Nauka i studia*. P. 39–43.
- Данилов Л.Г. Особенности экологии и распространения энтомопатогенных нематод в различных экосистемах. // *Вестник защиты растений*, 2005. N 1. С. 18–26.
- Иванова Т.С., Данилов Л.Г., Ивахненко О. А. Новый подвид энтомопатогенных нематод семейств *Steinernema feltiae protense* subsp. n. (Nematoda: Steinernematidae) из Якутии. *Паразитология*, 2001. Вып. 35. N 4. С. 333–337.
- Пойнара Дж.О., Веремчук Г.В. Новый штамм энтомопатогенных нематод и географическое распространение *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditidae: Steinernematidae) // *Зоологический журнал*. 1970. 49 (7). С. 966–969.
- Gaugler R., Campbell J. McGuire T. Selection for host-finding in *Steinernema feltiae* // *J. Invertebr. Pathol.* 1989. Vol. 54. P. 363–372.
- Gaugler R., Lewis E., Stuart R.J. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes // *Oecologia*. 1997. Vol. 109. Iss. 4. P. 483–489.
- Denno, R. F., Gruner, D. S., & Kaplan, I. Potential for entomopathogenic nematodes in biological control: A meta-analytical synthesis and insights from trophic cascade theory // *J. of Nematology*, 2008. 40(2). P. 61–72.
- Lacey, L. A., Georgis, R. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production // *J. of Nematology*. 2012. 44(2). P. 218–225.
- Liu J., Poinar G., O., Berri R. E. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: the impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction // *Ann. Appl. Entomol.* 2000. Vol. 45. N 1. P. 287–306.
- Milstead J.E. Influence of temperature and dosage on mortality of seventh instar larvae of *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) caused by *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida) and *Xenorhabdus luminescens* // *Nematologica*. 1981. Vol. 27. N 2. P. 167–171.
- Morton A, Garcia-del-Pino F. Ecological characterization of entomopathogenic nematodes isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas // *J. of Invertebrate Pathology*. 2009. 102(3). P. 203–213.
- Salame L, Glazer I, Miqaia N, Chkhubianishvili T. Characterization of populations of entomopathogenic nematodes isolated at diverse sites across Israel // *Phytoparasitica*. 2010.38(1). P. 39–52.
- Shapiro-Ilan DI, Brown I, Lewis EE. Freezing and desiccation tolerance in entomopathogenic nematodes: Diversity and correlation of traits // *J. of Nematology*. 2014. 46(1). 27–34 pp.

#### Translation of Russian References

- Danilov L.G. Features of ecology and distribution of entomopathogenic nematodes in different ecosystems. // *Vestnik zashchity rasteniy*. 2005. N 1. P. 18–26. (In Russian).
- Danilov L.G., Pavlyushin V.A., Nashchekina T.Yu., Ayrapetyan V.G. A new natural isolate of entomopathogenic nematodes active at low temperatures. In: *Materiały VII Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Perspektywiczne opracowania są nauką i technikami – 2011»* V. 42. *Nauk biologicznych: Przemysł. Nauka i studia*. P. 39–43. (In Russian).
- Ivanova T.S., Danilov L.G., Ivakhnenko O.A. New subspecies of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae protense* subsp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from Yakutia. *Parazitologiya*. 2001. V. 35. N 4. P. 333–337. (In Russian).
- Poynara J.O., Veremchuk G.V. New strain of entomopathogenic nematodes and geographic distribution of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditidae: Steinernematidae) // *Zoologicheskij zhurnal*. 1970. V. 49(7). P. 966–969. (In Russian).
- Vasilyev S.V., Polyakov I.Ya., Sergeev G.E. Theory and methods of mathematical modelling and computer use in plant protection. In: *Tr. VIZR*. 1973. V. 39. P. 61–106. (In Russian)
- Veremchuk G.V., Danilov L.G. Guidelines on the assessment of invasive activity of nematode cultures of genus *Neoaplectana* (Steinernematidae). Leningrad. 1978. 11 p. (In Russian).
- Veremchuk G.V., Danilov L.G. On defining invasive *Neoaplectana carpocapsae* Weiser activity (Steinernematidae). In: *Tez. dokl. Vses. nauchn. konf. Mikrobiologicheskiye metody borby*. Kishinev. 1976. P. 132–134. (In Russian).

*Plant Protection News*, 2018, 3(97), p. 38–42

## FEATURES OF INVASIVE ACTIVITY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (NEMATODA: STEINERNEMATIDAE) DEPENDING ON BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS OF ENVIRONMENT

L.G. Danilov

*All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia*

A comparative assessment of the features of invasive activity of two species of nematodes of the family *Steinernematidae* is provided, based on a mathematical modeling of dependence of intensity of invasive activity and mortality of insects on the host environment exposure (low dose exposure, duration of the period of free contact). Nematode *Steinernema feltiae protense* provide a higher mortality rate over a wide temperature range (6 to 28 °C), whereas *Steinernema carpocapsae* strain “*agriotos*” range is 20 to 28 °C. *S. feltiae protense* demonstrates more prospects for the use as a biological agent than *S. carpocapsae*.

**Keywords:** entomopathogenic nematode, *Steinernematidae*, invasive activity, infective larva.

#### Сведения об авторе

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация  
Данилов Леонид Григорьевич. Ведущий научный сотрудник, доктор сельскохозяйственных наук, e-mail: biodan@mail.ru

#### Information about the author

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo Shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation  
Danilov Leonid Grigorievich. Leading researcher, DSc in Agriculture, e-mail: biodan@mail.ru