

УДК 632.768.12/.937.14 (574.51)

Слямова Н.Д., Смагулова Ш.Б., Абдукадырова А.Д., Болатбекова Б.К., Успанов А.М.

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений им. Ж. Жиембаева», г. Алматы

ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ЧИСЛЕННОСТИ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ В УСЛОВИЯХ ЮГО-ВОСТОКА КАЗАХСТАНА

Аннотация

Проведен первичный скрининг 9 новых природных изолятов гриба *Beauveria bassiana*, выделенных из насекомых различных систематических групп, по признаку вирулентности на личинках 2-3 возрастов колорадского жука. Наибольшую вирулентность на личинках, как младших, так и старших возрастов проявили только три штамма: ВС₆-12, ВС₇-12, ВС₈-12. На личинках второго и четвертого возрастов колорадского жука определены оптимальные дозы заражения вредителя для отобранных штаммов.

Определена динамика радиального роста колоний штаммов гриба *B. bassiana* при разной температуре воздуха. Проведен сбор личинок и имаго колорадского жука первого и второго поколений в местах их массового размножения для определения возрастной (личиночные возраста) и фазовой (личинки и имаго) чувствительности вредителя к отобранным штаммам энтомопатогенных грибов.

Проведены исследования уровня прорастания конидий новых природных изолятов гриба *B. bassiana* s.l. на различных субстратах и при разной температуре воздуха. Так же был проведен ряд экспериментов в полевых условиях, направленных на определение биологической активности полупрепаративных форм микоинсектицидов на основе отобранных штаммов ВС₈-12 гриба *B. bassiana* s.l. (сухой порошок) в отношении личинок 2-го возраста колорадского жука первого и второго поколений.

Ключевые слова: биотехнология, гриб, патоген, микоинсектицид, эффективность.

Введение

Фитосанитарная нестабильность агроценозов, отмечаемая в последние десятилетия, в значительной мере определяется вредителями и болезнями, способными к массовому размножению и распространению на огромных территориях. К числу фитофагов, вызывающих нередко чрезвычайные ситуации в растениеводстве, отнесен и колорадский жук [1].

Колорадский картофельный жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) — один из наиболее необычных по своей активности видов насекомых, который уже на памяти людей перешел к питанию листьями культурного картофеля с дикорастущих пасленовых (штат Колорадо, Скалистые горы) [1]. Проблема защиты картофеля от этого вредителя в усложненных условиях современного АПК многих стран СНГ приобрела государственное значение. В частности в России потери урожая, вызванные колорадским жуком, в 1995-1999 гг. достигали 40-50%; в 1999 году они оценены в несколько миллиардов рублей.

Чрезвычайно высокая экологическая пластичность, определяемая генетическим и физиологическим полиморфизмами, позволяет колорадскому жуку легко адаптироваться в новых ареалах. Впервые на территории Алматинской области колорадский жук был зарегистрирован в 1987 году [2]. Данный вид, как один из наиболее инвазивных и вредоносных, к настоящему времени обнаружен почти во всех областях республики.

Начиная с 1990-х годов, во многих районах страны наблюдаются массовые вспышки размножения данного вида вредителя, приводящие к катастрофическим потерям урожая картофеля.

В настоящее время в Казахстане для контроля численности колорадского жука используются только химические инсектициды. Однако, как известно, масштабное использование пестицидов имеет ряд существенных недостатков, важнейшими из которых являются возникновение резистентных популяций вредителей и загрязнение окружающей среды.

Начиная с 50-60-х годов XX века, для подавления численности колорадского жука большой интерес во многих странах мира приобрели разработки в области создания микробиологических препаратов на основе энтомопатогенных бактерий и грибов [3]. К настоящему времени в мировой практике используется более десяти препаративных форм на основе данных групп патогенов для борьбы с этим вредителем. На территории бывшего СССР работы в этом направлении проводились достаточно активно [4,5]. К сожалению, в настоящее время в странах СНГ, и в частности в Казахстане, нет в списках разрешенных ни одного микоинсектицида для контроля численности колорадского жука.

Цель работы – отбор штаммов энтомопатогенных грибов из коллекции лаборатории биотехнологии КазНИИЗиКР, перспективных для разработки новых микоинсектицидов против колорадского жука в условиях Казахстана.

Материалы и методы исследований

В работе использованы общепринятые методики в микробиологии, биотехнологии и защите растений. Исследования проводились в лаборатории биотехнологии КазНИИЗиКР; личинки и имаго колорадского жука, использованные в опытах, собраны на картофельных полях Карасайского района, Алматинской области.

Из коллекции лаборатории биотехнологии института были отобраны штаммы энтомопатогенных грибов (*Beauveria bassiana*) для оценки их вирулентности на колорадском жуке.

В качестве среды для получения посевного материала использовали модифицированную среду Сабуро [6-9]. Глубинное культивирование гифомицетов проводили в колбах так же на этой среде без добавления агар-агара. Колбы помещали на качалку, культивирование – 6-9 суток. Титр конидий определяли методом прямого подсчета в счетной камере Горяева [9-11].

Личинок и имаго тест-насекомых содержали в садках, покрытых мельничным газом, при естественном освещении и комнатной температуре. Ежедневно кормили свежими листьями картофеля.

Лабораторную оценку биологической эффективности грибов проводили по стандартным методикам в садках. Тест-насекомые помещались по 10 особей на садок, который представляет собой пластиковый стакан объемом 1000 мл, закрытый мельничным газом. Повторность 4-х кратная. Заражение личинок жука энтомопатогенными грибами проводили путем обмакивания последних на три секунды в суспензию конидий патогена из расчета 2 мл суспензии на 20 особей. В первую очередь обрабатывали контроль дистиллированной водой. Затем суспензией гриба обрабатывали тест-насекомых. Обработку корма проводили из расчета 2 мл суспензии на 10 листьев картофеля.

В полевых условиях обработку проводили моторным ранцевым опрыскивателем «SOLO-450». Варианты опыта: контроль (без обработки), полупрепаративная форма энтомопатогенного гриба (BC_{i6}-12, BC_{i7}-12, BC_{i8}-12) с титром спор в рабочей жидкости $3,3 \times 10^6$ в мл. Обработки проводились в вечерние часы в сухую безветренную погоду, в период вегетации, во время массового появления личинок колорадского жука. Обычно

температура воздуха находилась в пределах 20-28°C, влажность – 70-85%. Биопрепарат применяли методом сплошной наземной обработки. В качестве эталона использовали российский штамм ББК-1. Были обработаны участки размером 25 м.кв. Доза внесения препарата - из расчета 1×10^{12} спор на 1 га. Рабочая жидкость готовилась на основе растительного масла.

Эффективность препаративных форм *Beauveria bassiana* определялась на 5 учетных площадках, расположенных равномерно по диагонали опытной делянки. Каждая площадка охватывает 5 рядов по 10 кустов в ряду. Учет численности жуков, количества яйцекладок и личинок (с указанием их возраста) проводился: перед обработкой, через каждые три дня после обработки в течение 20 дней на 10 рендомезированно отобранных кустах на каждой учетной площадке. Расчеты велись по каждой учетной площадке, а затем определялась средняя численность по каждому варианту.

Техническая эффективность определяется сравнением численности личинок до и после обработки и выражается в процентах снижения численности.

Учет проводят согласно формуле Аббота (1):

$$\mathcal{E} = \frac{a - b}{a} \times 100, \text{ где:}$$

\mathcal{E} – эффективность, выраженная в процентах снижения численности вредителя с поправкой на контроль; a – численность живых особей в контроле в данный срок учета; b – численность живых особей в опыте в данный срок учета [12].

Были собраны немногочисленные трупы насекомых на обработанных площадях, в том числе и в контроле, после чего трупный материал помещали во влажную камеру для наблюдений за вероятным проявлением микоза. Реизоляция проведена по общепринятым микробиологическим методикам по выделению энтомопатогенных микроорганизмов [13].

Математическая обработка экспериментальных данных сделана с использованием методов вариационной статистики, дисперсионного и регрессионного анализов [14].

Результаты исследования и их обсуждение

Из коллекции института были отобраны штаммы энтомопатогенных грибов (*Beauveria bassiana*) для оценки их вирулентности на колорадском жуке. В эксперименте использовали штаммы гриба *B.bassiana*, выделенные из жуков-долгоносиков (сем.Curculionidae), божьих коровок (сем.Coccinellidae), жуков жужелиц (отр.Coleoptera сем. Carabidae) и листоедов (сем.Chrysomelidae).

В ходе исследований нами был проведен первичный скрининг 9 новых природных изолятов гриба *B. bassiana*, выделенных из насекомых различных систематических групп, по признаку вирулентности на личинках 2-3 возраста колорадского жука. Из них 5 штаммов показали высокую вирулентность в отношении личинок колорадского жука (от 80 до 100%). В контроле смертность личинок колорадского жука не превышала 5%.

Таблица 1- Биологическая активность штаммов гриба *B.bassiana* в отношении личинок колорадского жука II-III возрастов, титр 1×10^7 спор/мл (лабораторный опыт, 2013 г.)

| Штамм | Смертность %, сутки | | | | |
|----------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 |
| BC ₃ -12 | 0,0 | 0,0 | 10,0±4,08 | 10,0±4,08 | 15,0±2,88 |
| BC ₆ -12 | 40,0±7,07 | 57,5±14,9 | 82,5±8,53 | 100 | 100 |
| BC ₇ -12 | 25,0±5,0 | 25,0±5,0 | 35,0±5,0 | 42,5±8,53 | 92,5±7,5 |
| BC ₈ -12 | 40,0±4,08 | 52,5±6,29 | 100 | 100 | 100 |
| BIn ₆ -12 | 0,0 | 2,5±2,5 | 10,0±4,08 | 15,0±2,88 | 20,0±4,08 |
| BL ₁ -12 | 2,5±2,5 | 10,0±4,08 | 17,5±4,78 | 50,0±18,7 | 95,0±5,0 |

| | | | | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ВАР ₂ -12 | 10,0±5,77 | 17,5±7,5 | 22,5±4,78 | 52,5±13,1 | 100 |
| ВLe ₈ -12 | 0,0 | 0,0 | 2,5±2,5 | 7,5±2,5 | 15,0±6,45 |
| ВIn ₄ -12 | 35,0±8,66 | 52,5±7,5 | 52,5±7,5 | 65,0±8,66 | 65,0±8,66 |
| ВLe-06 (эталон) | 44,0±12,1 | 76,0±12,9 | 92,0±5,8 | 100 | 100 |
| Контроль | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,5±2,5 |
| НСП | 13,117 | 18,783 | 14,137 | 24,200 | 13,826 |

Все отобранные штаммы гриба *B. bassiana* проявили высокую вирулентность по отношению к личинкам 2-3 возрастов колорадского жука. Имаго жука обладает повышенной устойчивостью по сравнению с личинками к исследуемым культурам. При этом выявлен один изолят, проявляющий высокую биологическую активность к данной фазе вредителя (BCi₈-12).

Проведенные наблюдения за зараженными грибом личинками и имаго жука показали следующие характерные особенности. На 2-3-й день после инокуляции на кутикуле личинок жука появлялись меланиновые пятна, что свидетельствует об успешном внедрении конидий патогенов в тело хозяина. На 2-4-ые сутки после заражения личинки вредителя прекращают питаться и на корме не видно следов обгрызания. На кутикуле имаго меланиновые пятна незаметны. Взрослые жуки, также как и личинки, перестают питаться на 2-4 сутки после инокуляции. При пониженных титрах водной суспензии конидий (5×10^6 и 1×10^7) наибольшую вирулентность на личинках младших и старших возрастов колорадского жука проявили три изолята: BCi₆-12, BCi₈-12, ВАР₂-12.

В 2014 году определена динамика радиального роста колонии отобранных штаммов гриба *B. bassiana* при разной температуре воздуха. При культивировании на среде Сабуро для всех изолятов максимальный прирост колоний наблюдался при температурах +20°C, +25°C.

С точки зрения наработки конидий, наиболее продуктивным штаммом является BCi₈-12. В этом случае суммарный выход спор составлял $3,4-3,9 \times 10^9$ конидий/г (таблица 2).

Таблица 2 - Продуктивность штаммов *B. bassiana* при поверхностном культивировании на сыпучих субстратах (лабораторный опыт, 2013 г.)

| Штамм | Титр $n \times 10^8$ /г (сутки) | | | |
|----------------------|---------------------------------|---------|----------|----------|
| | 5 | 10 | 15 | 20 |
| BCi ₆ -12 | 0,5±0,2 | 7,0±0,5 | 17,5±0,4 | 30,5±2,7 |
| BCi ₇ -12 | 0,2±0,1 | 5,0±0,3 | 12,2±0,5 | 25,0±2,5 |
| BCi ₈ -12 | 0,8±0,1 | 9,2±0,7 | 30,5±2,7 | 34,4±4,7 |
| ВLe-06 (эталон) | 1,0±0,3 | 9,6±0,8 | 19,3±0,6 | 39,9±8,1 |
| НСП ₀₅ | 0,5 | 1,7 | 4,4 | 14,2 |

На основе этой культуры наработаны экспериментальные партии препаратов для полевых испытаний на колорадском жуке.

Для определения специфичности отобранных штаммов проводились испытания на гусеницах крапивницы, пяденицы, яблонной моли, листовертки, американской белой бабочки, а также на личинках саранчовых. В результате испытания против чешуекрылых и прямокрылых вредителей сельского хозяйства все протестированные штаммы оказались средне-и слабовирулентными. Исходя из этого, можно предположить, что отобранные штаммы специфичны только для колорадского жука.

В 2015 году был проведен ряд экспериментов в полевых условиях, направленных на определение биологической активности полупрепаративных форм микоинсектицидов на основе отобранного штамма ВСi₈-12 гриба *B. bassiana* s.l., сухой порошок, в отношении личинок 2-го возраста колорадского жука первого и второго поколений.

Полевые эксперименты по оценке эффективности ППФ в отношении личинок колорадского жука проводились на картофельных полях в Джамбулском районе Алматинской области.

Испытуемая ППФ на основе штамма ВСi₈-12 гриба *B. bassiana* s.l. проявила высокую биологическую активность в отношении личинок колорадского жука первого поколения. На 11-е сутки гибель вредителя составляла до 55,0%, а на девятнадцатый день эксперимента зараженные особи погибли на 87,0%. При этом смертность в контроле не превышала 5% (таблица 3).

Таблица 3 – Определение биологической эффективности ППФ, с.п. на основе штамма ВСi₈-12 гриба *B. bassiana* против личинок колорадского жука 1 поколения (полевой опыт, 2015 г.)

| Штамм | Смертность %, сутки | | | | | | |
|----------------------|---------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 | 17 | 19 |
| Контроль | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 2,5±2,5 | 2,5±2,5 | 2,5±2,5 | 2,5±2,5 | 5,0±2,9 |
| ВСi ₈ -12 | 7,5±4,8 | 35,5±8,7 | 55,0±9,6 | 62,5±11,1 | 65,0±11,9 | 65,0±11,9 | 87,0±11,9 |
| ББК | 8,1±5,3 | 13,6±5,4 | 21,1±3,5 | 35,9±5,9 | 42,2±6,0 | 57,5±3,4 | 81,3±1,9 |
| НСР | - | - | 27,12 | 26,19 | 22,17 | 23,54 | 19,16 |

По результатам эксперимента на колорадском жуке второго поколения проведенные наблюдения показали, что смертность личинок вредителя была существенно ниже, чем в первом поколении. Хотя гибель насекомых сильно растянута во времени, уже на одиннадцатый день после заражения уровень смертности личинок варьировал в пределах 25%, на 13-18-е сутки смертность достигла 32,5%-45,1%, на 19-е сутки после инокуляции биологическая активность составила всего 55,5%.

После эксперимента всех погибших особей отбирали, в дальнейшем трупы помещали во влажную камеру с целью установления причины смерти и уровня обрастания погибших особей. Во влажной камере через трое суток тела погибших личинок покрывались мицелиальным налетом, подтверждая гибель личинок именно от воздействия микоинсектицида.

Выводы

Таким образом, на основании вышеизложенного можно отметить следующие: протестированный штамм ВСi₈-12 *B. bassiana* оказался высоковирулентными по отношению к личинкам колорадского жука первого поколения, а в отношении второго поколения он показал себя средневирулентным. В полевых условиях с помощью энтомопатогенных грибов, возможно, контролировать численность вредителя, однако для микозов характерно длительное течение патогенеза. Для успешного развития микозов, вызываемых энтомопатогенными грибами необходимы высокие инфекционные нагрузки, составляющие десятки и сотни тысяч на одну особь. Однако эти дозы могут быть значительно снижены под действием различных иммуносупрессоров (сублетальные бактериальные инфекции, низкие дозы синтетических и растительных инсектицидов, яд паразитоидов и др.). В частности, в настоящее время показана наибольшая перспективность разработки комбинированных препаратов против колорадского жука на основе смесей энтомопатогенных грибов с бактериями, низкими дозами инсектицидов, вторичными метаболитами растений.

В данный момент подана заявка на инновационный патент изобретения для получения биопрепарата на основе штамма BC_{i8}-12 гриба *B. bassiana* против личинок колорадского жука.

Литература

1. Захаренко В.А. Экономика защиты картофеля от колорадского жука. //Современные системы защиты и новые направления в повышении устойчивости картофеля к колорадскому жуку - М., 2000.-С.192-197.
2. Искаков, Красникова. //Овощные вредители - Алматы, Бастау, 1991.-С22.
3. Сикура А.И., Сикура Л.В. //Энтомопатогены – грибы, бактерии, простейшие, нематоды// Колорадский картофельный жук.- М.: Наука, 1981.- 123 с.
4. Цибульская А.И. Применение рижского штамма гриба белой мускардины в борьбе с колорадским жуком. / Патология насекомых и клещей.-Рига, 1972.-162 с.
5. Павлюшин В.А. Биологическая защита растений от колорадского жука. // Защита и карантин растений,-М.: Колос, 2000- №10. – 48 с.
6. Билай В.И. (ред.) Методы экспериментальной микологии Справочник. Киев, "Наукова думка", 1982. - 550 с.
7. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. / Под.ред. В.В. Глупов - М.: Круглый год, 2001.-736 с.
8. Faria, M., Wraight, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. //Biological Control. 2007.V.43, -237-256 p.
9. Cliquet S., Jackson M.A. Comparison of air - drying methods for evaluating the desiccation tolerance of liquid culture - produced blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus*. // World J. Microbiol. Biotech. 1997. V. 13. -P. 299 - 303.
10. Штерншис М.В., Ермакова Н.И., Зурабова Э.Р., Исангалин Ф.С. Методические рекомендации. - М.,1990. -14 с.
11. Лабинская А.С. Практическое руководство по микробиологическим методам исследования. – М.: Гос. изд.-во мед. лит.-ры., 1963 – 463 с.
12. Временные методические указания по критериям эффективности энтомофагов и энтомопатогенов. - М. - 1988. – 27 с.
13. Практикум по микробиологии. Под редакцией профессора А.И. Нетрусова. Москва, 2005. –С. 105-107.
14. Плохинский Н.А. Биометрия.- М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.

Slyamova N.D., Smagulova S.B., Abdukadyrova A.D., Bolatbekova B.K., Uspanov A.M.

The Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine, Almaty,

ENVIRONMENTALLY SAFE METHODS TO CONTROL THE NUMBER OF COLORADO POTATO BEETLE WITH USE OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN THE CONDITIONS OF SOUTHEAST KAZAKHSTAN

Abstract

Conducted initial screening of 9 new natural isolates of the fungus *Beauveria bassiana* isolated from insects of different systematic groups, on the basis of virulence on the larval of 2-3 instars of the Colorado potato beetle. The highest virulence to the larvae, both younger and older ages showed only three strains: BC_{i6}-12, BC_{i7}-12, BC_{i8}-12. On the larvae of the second and

fourth instars of the Colorado potato beetle identified the optimal dose of infection of the pest for selected strains.

The dynamics of radial growth of colonies of strains of the fungus *B. bassiana* at different temperatures. A collection of larvae and adults of Colorado potato beetle first and second generations in places of their mass reproduction for the age (larval age) and phase (larvae and adult) sensitivity of the pest to the selected strains of entomopathogenic fungi.

To research the level of germination of conidia of new natural isolates of the fungus *B. bassiana* s.l. on various substrates and at different temperatures. Was also conducted a series of experiments in the field, aimed at determining the biological activity of semi preparative forms of mycoinsecticides on the basis of selected strains BCi8-12 fungus *B. bassiana* s.l., (dry powder) against larvae of the 2nd age of the Colorado potato beetle first and second generations.

Слямова Н.Д., Смагулова Ш.Б., Абдукадырова А.Д., Болатбекова Б.К., Успанов А.М.

ЖШС «Ж.Жиембаев атындағы Қазақ өсімдік қорғау және карантин ғылыми-зерттеу институты», Алматы қаласы,

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ОҢТҮСТІК-ШЫҒЫС ЖАҒДАЙЫНДА ЭНТОМОПАТОГЕНДІ САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРДЫ ҚОЛДАНУ АРҚЫЛЫ КОЛОРАДО ҚОҢЫЗЫНЫҢ САН МӨЛШЕРІН БАҚЫЛАЙТЫН ЭКОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗ ТӘСІЛДЕР

Түйіндеме

Қазақстан жағдайында колорад қоңызына қарсы жаңа микоинсектицидтерді өндіру үшін институт коллекциясынан энтомопатогенді саңырауқұлақ штаммдарын іріктеу.

Beauveria bassiana саңырауқұлағының бунақденелердің әр түрлі систематикалық топтарынан бөлінген жаңа изоляттарына уыттылығы бойынша колорад қоңызының 2-3 жас мөлшерлік дернәсілдеріне алғашқы скрининг өткізілді. *B.bassiana* саңырауқұлағының іріктеліп алынған барлық штаммдары колорад қоңызының кіші және үлкен жастағы дернәсілдеріне жоғары уыттылық көрсеткені анықталды.

Зерттеліп отырған үш штамм да 25°C температурада қарқынды өсу деңгейін көрсетті. *B. bassiana* s.l. саңырауқұлағы BCi8-12 штаммының негізінде жасалған ЖПФ колорад қоңызының бірінші ұрпағына қарсы жоғары биологиялық белсенділікті көрсетті.

ӘОЖ 635.63:631.544.71

Смағұлова Д.Ә., Кусаинова Г.С.

Қазақ ұлттық аграрлық университеті

АЛМАТЫ ОБЛЫСЫ ЖАҒДАЙЫНДА АШЫҚ ТАНАПТА ҚАУДАНДЫ ЖӘНЕ ЖАПЫРАҚТЫ САЛАТ СОРТТАРЫН ЗЕРТТЕУ

Андатпа

Қазіргі уақытта Қазақстанда аз таралған көкөніс дақылдарына қызығушылық артуда, халықты жыл бойы отандық көкөніс дақылдарымен қамтамасыз етуге назар аударылуда. Бұл мақалада Алматы облысы жағдайында ашық танапта қауданды және жапырақты салат сорттарын зерттеу мәселесі қаралған. Зерттеу жұмыстарының нәтижесінде қауданды және