

на правах рукописи

ОХЛОПКОВА ОЛЕСЯ ВИКТОРОВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НЕПАРНОГО
ШЕЛКОПРЯДА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИРУСА ЯДЕРНОГО
ПОЛИЭДРОЗА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВИРУСА В
КОМПОЗИЦИИ С *Bacillus thuringiensis***

**03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Кольцово – 2019

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный

руководитель:

Колосов Алексей Владимирович,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник отдела биофизики и
экологических исследований,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

**Официальные
оппоненты:**

Пономарев Василий Иванович,
доктор биологических наук,
заместитель директора по научной работе,
заведующий лабораторией лесовосстановления,
защиты леса и лесопользования,
ФГБУН Ботанический сад УрО РАН

Железниченко Татьяна Витальевна,
кандидат биологических наук,
научный сотрудник лаборатории биотехнологии,
ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад
СО РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений», г. Краснодар

Защита состоится «26» декабря 2019 г. в ____ ч на заседании диссертационного совета Д. 208.020.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. (383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.М. Зубавичене

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В России от различных негативных факторов ежегодно погибает около 300 тыс. га лесов, на долю насекомых в этом процессе приходится в среднем 36 тыс. га, или более 10 %. В отдельные годы влияние этого фактора увеличивается до 30-50 %. На территории РФ наибольшие по площади очаги среди дендрофильных насекомых образует непарный шелкопряд: площадь его очагов в среднем ежегодно составляет 726 тыс. га.

Для решения этой проблемы на протяжении долгого времени в качестве защиты леса от насекомых-вредителей, в частности от непарного шелкопряда, использовались химические пестициды, которые характеризуются высокой эффективностью и экономичностью. Основным недостатком этого вида химических веществ является способность сохраняться и мигрировать в естественной среде, что создает риск для здоровья людей. Кроме того, при систематическом применении химических инсектицидов многие насекомые-фитофаги теряют чувствительность к ним.

Биологическая защита лесного комплекса становится все более перспективной и эффективной альтернативой использованию ядохимикатов. Под биологической защитой понимают совокупность методов, направленных на защиту растений от насекомых-вредителей с применением их естественных врагов. Биометод включает в себя использование биопрепаратов, действующим компонентом которых могут быть биологические агенты, такие как вирусы, бактерии, простейшие и грибы.

В обширном комплексе энтомопатогенных микроорганизмов, оказывающих влияние на динамику численности фитофагов, одно из важных мест занимает семейство вирусов *Baculoviridae*. Их применение не имеет последствий для человека, животных и растений; воздействие на насекомых более селективное, чем в случае с химическими инсектицидами; вирусные

биопрепараты вызывают эпизоотии, передавая инфекции не только горизонтально, но и вертикально.

Ключевым моментом для получения вирусных агентов и их тестирования является культивирование лабораторной популяции насекомых. Текущий уровень исследований не позволяет круглогодично получать гусениц целевого возраста не более чем, за 3 недели от момента выхода личинок из яиц. Поэтому было принято решение оптимизировать культивирование непарного шелкопряда, как наиболее актуального, карантинного фитофага для Сибирского федерального округа.

В настоящей работе использовали вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда штамм НШ-07, выделенный и идентифицированный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Штамм ВЯП НШ-07 обладает большей вирулентностью по отношению к непарному шелкопряду по сравнению с известными аналогами.

Цель данного исследования – оптимизировать культивирование непарного шелкопряда для наработки вируса ядерного полиэдроза и исследовать эффективность композиции вируса в составе с *Bacillus thuringiensis*.

В процессе работы решались следующие задачи:

1. подбор оптимальных условий для культивирования непарного шелкопряда (температура, влажность, питание);
2. получение имаго и жизнеспособного потомства непарного шелкопряда для формирования лабораторных резервов данного биоматериала;
3. стандартизация, получаемых насекомых, посредством фиксации основных параметров;
4. исследование патогенности вируса ядерного полиэдроза штамм НШ-07 по отношению к гусеницам непарного шелкопряда;
5. определение эффективности композиции вируса ядерного полиэдроза и *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* в лабораторных

экспериментах и полевых испытаниях по контролю численности непарного шелкопряда.

Научная новизна

Полученные нами данные дополняют исследования особенностей онтогенеза карантинных насекомых, культивируемых в лабораторных условиях. Предложена новая искусственная питательная среда для выращивания гусениц непарного шелкопряда. Оценена скорость достижения целевого (III) возраста гусеницами непарного шелкопряда при культивировании на искусственных кормах. Получены актуальные данные по влиянию физических факторов на культивирование насекомых. Получен новый, более вирулентный штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда и изучена чувствительность данных насекомых к нему. Предложены новые варианты комбинирования энтомопатогенных агентов для наиболее эффективного контроля численности непарного шелкопряда.

Практическая значимость

Разработка поможет оптимизировать выращивание лабораторных насекомых, что позволит увеличить эффективность технологии, сократить время производства и трудозатраты на культивирование и наработку вирусной биомассы.

Положения, выносимые на защиту

Культивирование гусениц непарного шелкопряда в лабораторных условиях эффективно при температуре $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ и повышенной относительной влажности воздуха – $70\% \pm 6\%$, что обеспечивает массовое достижение целевого (III) возраста насекомыми менее чем за 2 недели.

При использовании новой искусственной питательной среды на основе бобов чечевицы насекомые достигают целевого возраста в среднем за 1,5-2 недели, в то время как на среде сравнения более чем за 2,5 недели.

При культивировании непарного шелкопряда из яйца до куколки с учетом подобранных оптимальных условий получены фертильные имаго и

жизнеспособное потомство: с 1000 яиц – 100 бабочек, 100 бабочек произвели ~12000 яиц, отрождаемость яиц составила 85 %.

Для вируса ядерного полиэдроза штамма НШ-07 ЛВ₅₀ составляет 8 ± 1 сут, для штамма НШ-2-85 на 2 сут больше.

При использовании композиции вируса ядерного полиэдроза штамма НШ-07 с *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* достигнуты более короткие сроки наступления гибели непарного шелкопряда – ЛВ₅₀ 5 сут. Уменьшен расход агентов для *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* в 100 раз (с 5×10^7 спор/мл до 3×10^5 спор/мл) и для вируса ядерного полиэдроза с 10^7 пэ/мл до 10^5 пэ/мл в сравнении с моно препаратами.

Апробация работы

По результатам работы были представлены устные доклады на различных российских и международных конференциях, в том числе:

Ломоносов – 2016: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология» (Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 11–15 апреля 2016 г.);

Биология – наука XXI века: 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (г. Пушкино, 18–22 апреля 2016 г.);

Биотехнология, биоинформатика и геномика растений и микроорганизмов: Всероссийская молодежная научная конференция с международным участием (г. Томск, 26–28 апреля 2016 г.);

XXIV рабочая группа «Аэрозоли Сибири» (г. Томск, 28 ноября – 1 декабря 2017 г.);

X Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (г. Москва, 24 – 26 октября 2018 г.);

IX Международная научно-практическая конференция «Защита растений от вредных организмов» (г. Краснодар, 17 – 21 июня 2019 г.).

Также было опубликовано 15 тезисов в сборниках по материалам различных научных конференций.

Публикации

По материалам научно-исследовательской работы опубликованы две статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК:

Колосов А.В., Охлопкова О.В., Моисеева А.А., Кузнецов В.Е., Дручинина А.В., Томилов А.А. Использование комбинированных инфекций для контроля численности насекомых-вредителей // Защита и карантин растений. – 2019. – № 9 – С. 49–51;

Охлопкова О.В., Колосов А.В., Ананько Г.Г., Кузнецов В.Е., Дручинина А.В. Применение смешанных инфекций для сдерживания численности непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2019. – № 3(78) – С. 99–104.

Получен патент «Штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L., используемый для получения инсектицидного препарата».

Также получена положительная экспертная оценка на заявку на изобретение «Искусственная питательная среда для культивирования гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.)».

Разработаны и утверждены на уровне учреждения СОПы.

Объём и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 118 страницах, включает 10 рисунков, 11 таблиц, 3 приложения. Список литературы включает 142 источника.

Личный вклад автора

Участие в постановке задач, анализ литературных данных, проведение экспериментов, создание новой, экспериментально полученной искусственной питательной среды, ежегодный сбор яйцекладок непарного шелкопряда, проведение обследований и полевых обработок в Кыштовском

районе Новосибирской области, экспедиционная работа, участие в статистической обработке полученных результатов и написании нормативной документации.

Исследования были проведены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-416-540005 р_а и ГЗ 04/19.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении представлена актуальность темы исследования, описана степень ее разработанности, сформулированы цели и задачи, решенные в настоящей научно-исследовательской работе, раскрыта значимость диссертации и кратко сформулированы основные результаты исследования.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором описаны история развития прикладной энтомологии, проблемы, связанным с насекомыми-вредителями, методы борьбы с ними и рассматриваются современные биологические методы контроля численности насекомых-фитофагов. Кратко перечислены методы борьбы с использованием насекомых-энтомофагов, энтомопатогенных нематод, грибов, бактерий и вирусов. Далее подробно рассмотрены бакуловирусы, которые обладают исключительной специфичностью к своему видовому насекомому-хозяину и являются безопасными для человека, флоры и фауны. Уделено внимание также и получению комбинированных энтомопатогенных агентов. В заключительной части литературного обзора подробно разобраны все аспекты жизнедеятельности основного вредителя лесных массивов в Сибири – непарного шелкопряда. Описаны проблемы и методы его лабораторного культивирования. Дан подробнейший анализ современных подходов к культивированию непарного шелкопряда как основного звена в наработке вирусной биомассы.

Во второй главе охарактеризованы объекты исследования, описаны энтомологические и вирусологические методики, указаны условия

проведения и детали экспериментов. Для постановки всех экспериментов и в частности для разработки альтернативной искусственной питательной среды для лабораторного культивирования гусениц непарного шелкопряда ориентировались на метод математического планирования экспериментов (Лисенков А.Н., 1979; Пономарев В.И. и др., 2012). Эксперименты формировались из трех основных этапов: этап предположения, к примеру, ориентировочное определение на основе литературных данных концентраций компонентов или алгоритма действий; на втором этапе исключались гипотезы, не показавшие благоприятные результаты на практике; третий этап это отбор наиболее результативных комбинаций. Во всех экспериментах использовали яйцекладки западносибирской географической формы непарного шелкопряда. Отродившихся гусениц рассаживали от 10 до 30 шт в одну чашку Петри с питательной средой в зависимости от цели эксперимента. Количество насекомых в одном эксперименте варьировало от 500 до 1500 шт. В качестве критериев оценки результативности эксперимента учитывали такие показатели как – выживаемость особей, достижение целевых возрастов, вес, получение жизнеспособного потомства имаго, чувствительность к вирусу ядерного полиэдроза при заражении. Экспериментальные методы, используемые во время проведения исследования: приготовление искусственных питательных сред (ИПС), методики культивирования гусениц и имаго непарного шелкопряда (НШ), определение биологической активности вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) методом индивидуального заражения гусениц, методики выделения вируса и другие.

Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку. Статистическую значимость различий изучаемых параметров определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Статистическую обработку полученных результатов также проводили по методике оценки соответствия между ожидаемыми и найденными в опыте

величинами с использованием критерия χ^2 . Также использовался пробит-анализ данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для подбора наиболее благоприятных физических условий для культивирования НШ была проведена серия экспериментов. В первом термостате температура $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ и повышенная влажность воздуха ($70\% \pm 6\%$). Влажность создали с помощью увлажнителя воздуха DEXPJ-57D. Во втором термостате температура та же, влажность низкая ($40\% \pm 6\%$). Фотопериод (день/ночь) составил 16/8 ч. Результаты эксперимента приведены на рис. 1.

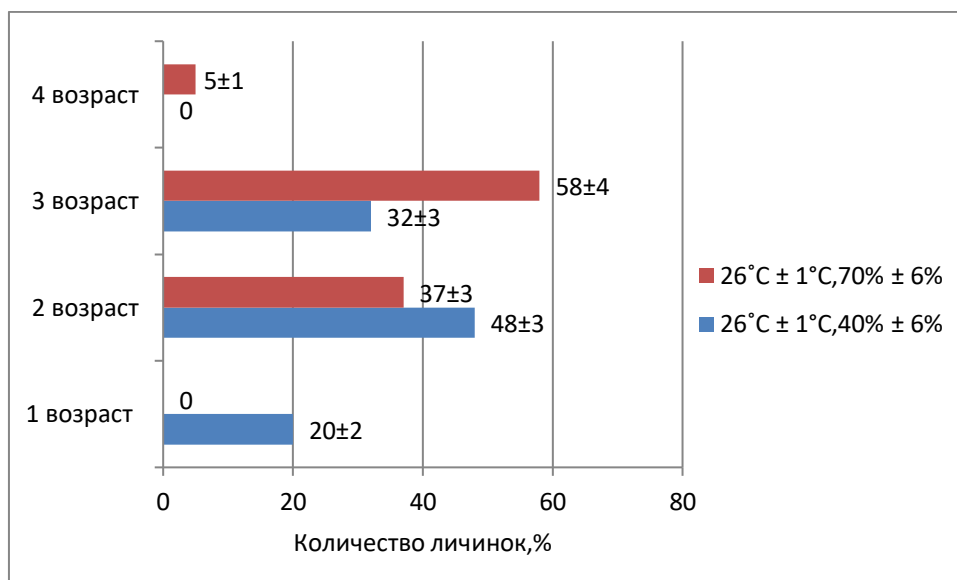


Рисунок 1. Соотношение возрастных групп НШ на 13 день от момента выхода личинок из яиц ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 6\%$; $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40\% \pm 6\%$), %

Таким образом, количество суток, необходимое для массового достижения целевого (III) возраста насекомыми, которых культивировали при температуре $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ и повышенной влажности ($70\% \pm 6\%$) в термостате 1, составило примерно 14 сут. Для насекомых, которых культивировали при той же температуре, но пониженной влажности ($40\% \pm 6\%$), данный показатель превысил 2 недели (рис. 1).

Также выполнена дополнительная серия экспериментов. В первом термостате температура пониженная ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) и повышенная влажность ($70\% \pm 6\%$). Во втором термостате температура та же, влажность низкая ($40\% \pm 6\%$). При использовании температуры $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ при культивировании НШ к 13 сут показатель особей, достигших целевого возраста, значительно ниже, несмотря даже на использование повышенной влажности в одном из термостатов (рис. 2). В данном случае повышенная влажность была благоприятна только в первую неделю культивирования насекомых, в дальнейшем она провоцировала учащение контаминации ИПС бактериями и грибами, что увеличивало частоту замены корма. При низкой влажности развитие личинок было подавлено. Это произошло ввиду того, что насекомые очень зависимы от влажности окружающей среды.

По результатам эксперимента мы можем сделать вывод о правильности наших предположений относительно влияния физических факторов на скорость достижения насекомыми целевого возраста.

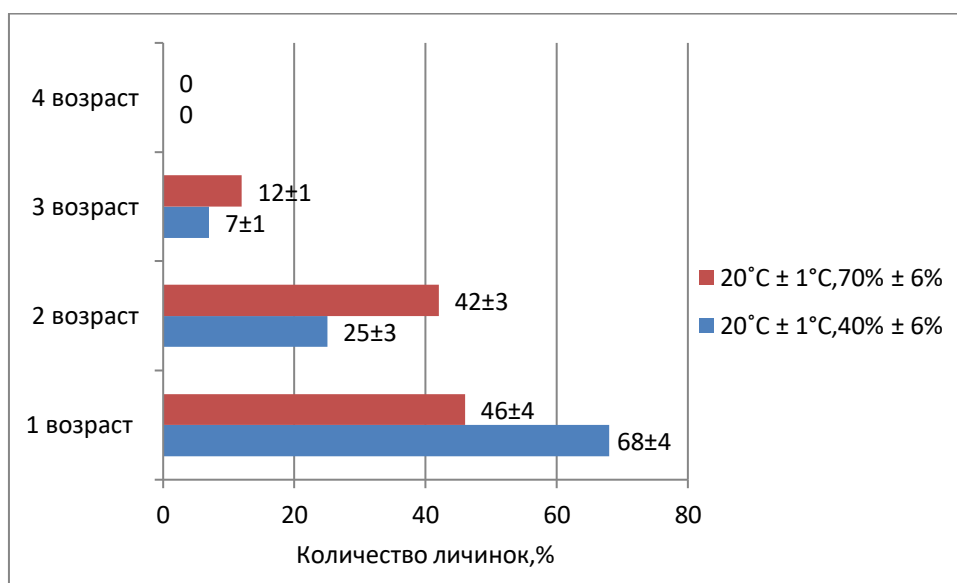


Рисунок 2. Соотношение возрастных групп НШ на 13 день от момента выхода личинок из яиц ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}, 70\% \pm 6\%$; $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}, 40\% \pm 6\%$), %

При рассмотрении рис. 3 заметно сочетанное влияние температурного фактора и влажности. При равных значениях влажности, но разных температурах отчетливо просматривается положительная тенденция при

использовании более высокой температуры. А вот при одинаково высокой температуре, но разнице в показателях влажности можно отметить менее отрицательные показатели относительно наиболее оптимальной температуре $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ и влажности $70\% \pm 6\%$. Самые неблагоприятные показатели по скорости достижения целевого возраста личинками НШ были получены при таких физических показателях: $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $40\% \pm 6\%$.

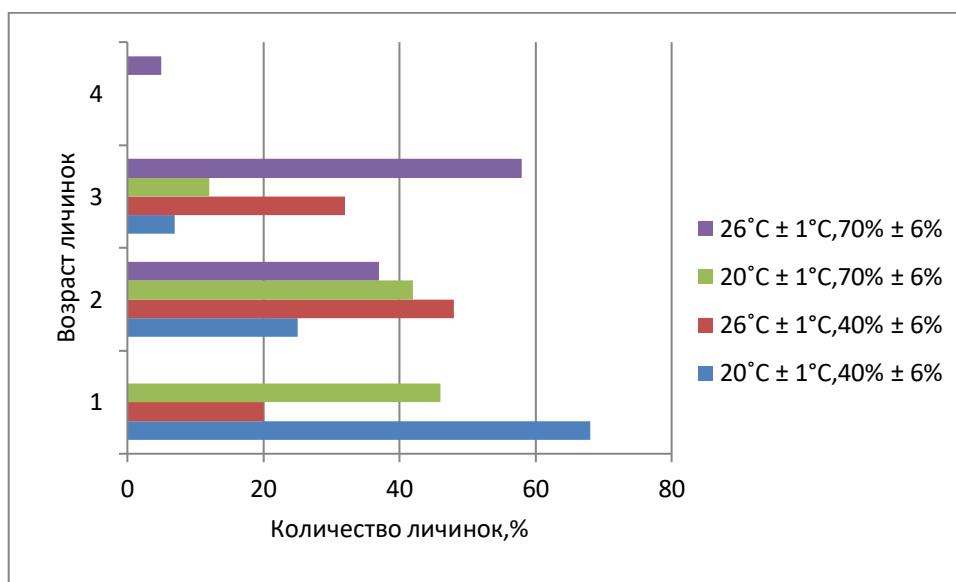


Рисунок 3. Соотношение возрастных групп НШ на 13 день от момента выхода личинок из яиц во всех экспериментах, %

Наиболее эффективной ИПС, среди предложенных, оказалась среда, основным компонентом которой, являлись бобы чечевицы (рецептура № 2 в гл. Материалы и методы, подраздел 2.1). Остальные составы нуждаются в дальнейшей доработке. Средой сравнения выступила известная среда А.В. Ильиных (рецептура № 1 в гл. Материалы и методы, подраздел 2.1). Оценку качества ИПС проводили посредством учета таких показателей: соотношение в составе корма макроэлементов (рис. 4), скорости достижения целевого возраста и веса насекомых. Предлагаемая ИПС дополнена водным раствором комплекса витаминов и микроэлементов при следующем соотношении компонентов (табл. 1).

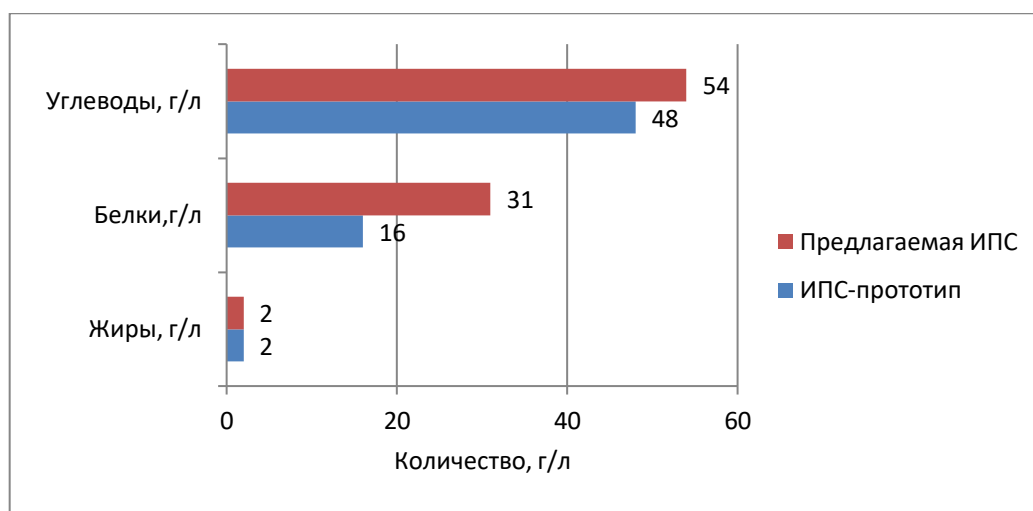


Рисунок 4. Анализ количества макронутриентов в составе среды-прототипа и предлагаемой ИПС, г/л

Таблица 1

Витаминный и микроэлементный состав разработанной ИПС, мг/л

Витамины	Количество
С (аскорбиновая кислота)	4000
А (ретинол)	1,4
В1 (тиамин)	2
В2 (рибофлавин)	2
В6 (пиридоксин)	3
В12 (цианокобаламин)	0,006
Е (токоферол)	20
D2 (эргокальциферол)	0,005
Р (рутин)	20
РР (никотиновая кислота)	15
Микроэлементы	Количество
Са (кальций)	70
Mg (магний)	44
Р (фосфор)	54
Fe (железо)	20
Cu (медь)	2
Zn (цинк)	10
Mn (марганец)	2
I (иод)	0,2
Se (селен)	0,02

Используя предлагаемую ИПС, среднее значение времени достижения целевого возраста гусеницами НШ варьировало в диапазоне $13,9 \pm 0,2$ сут, известная ИПС-прототип дала результат $17,4 \pm 0,3$ сут для получения насекомых III возраста. Таким образом, показатель количества суток на одну линьку для разработанной ИПС составил $6,9 \pm 0,1$ сут, для ИПС сравнения $8,7 \pm 0,1$ сут.

Как показывают полученные экспериментальные данные, при использовании заявляемого состава ИПС скорость достижения целевого возраста гусеницами НШ возрастает, общий вес насекомых имеет положительную тенденцию к росту (рис. 5), а количество макронутриентов и витаминов, получаемых вместе с новым кормом, превышает известный наиболее близкий аналог. Таким образом, применение предлагаемой ИПС позволяет оптимизировать процесс культивирования НШ.

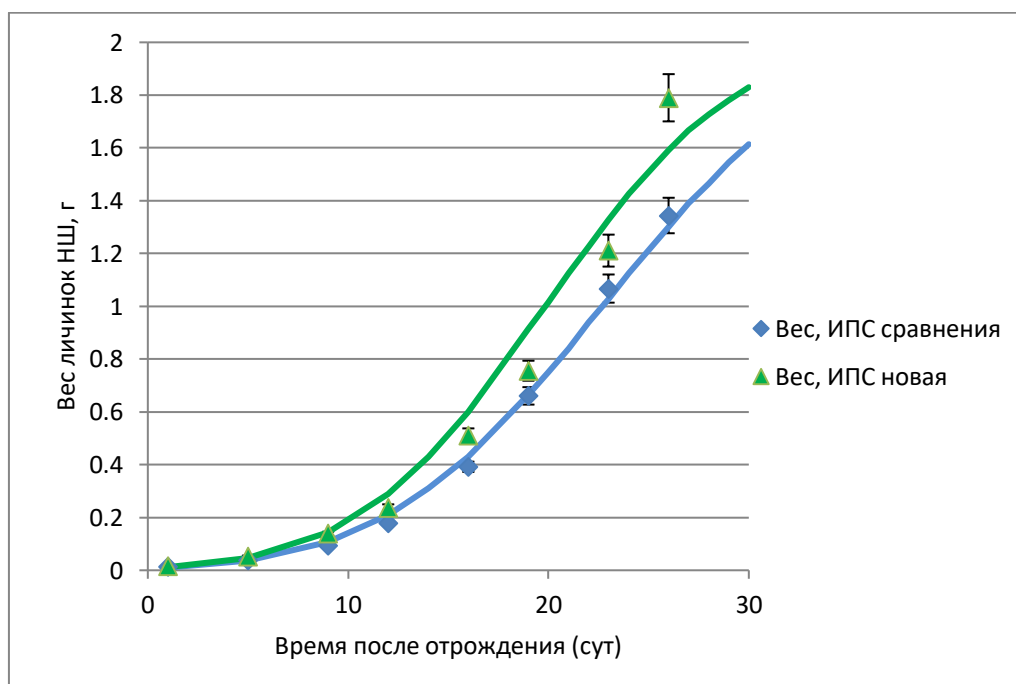


Рисунок 5. Сравнение динамик изменения веса гусениц НШ при питании средой сравнения и предлагаемой ИПС, г

Суммируя экспериментальный материал, можно заключить, что при выращивании насекомых на новой ИПС масса особей значительно возрастала. Что значительно улучшает методику круглогодичной наработки представленного биоматериала.

В лабораторных условиях необходимо поддерживать резервы биологического материала, с которым осуществляется экспериментальная работа. Для этого нужно получать имаго и кладки НШ непрерывно в течение всего года. Чтобы решить данную задачу с интервалом в 3 месяца была осуществлена активация яиц НШ.

В итоге было в среднем получено 45 пар имаго и 97 кладок яиц, одна кладка содержала в себе примерно от 50 до 250 яиц. Это количество полученного биоматериала позволяет формировать резервы для осуществления экспериментальной работы (рис. 6).

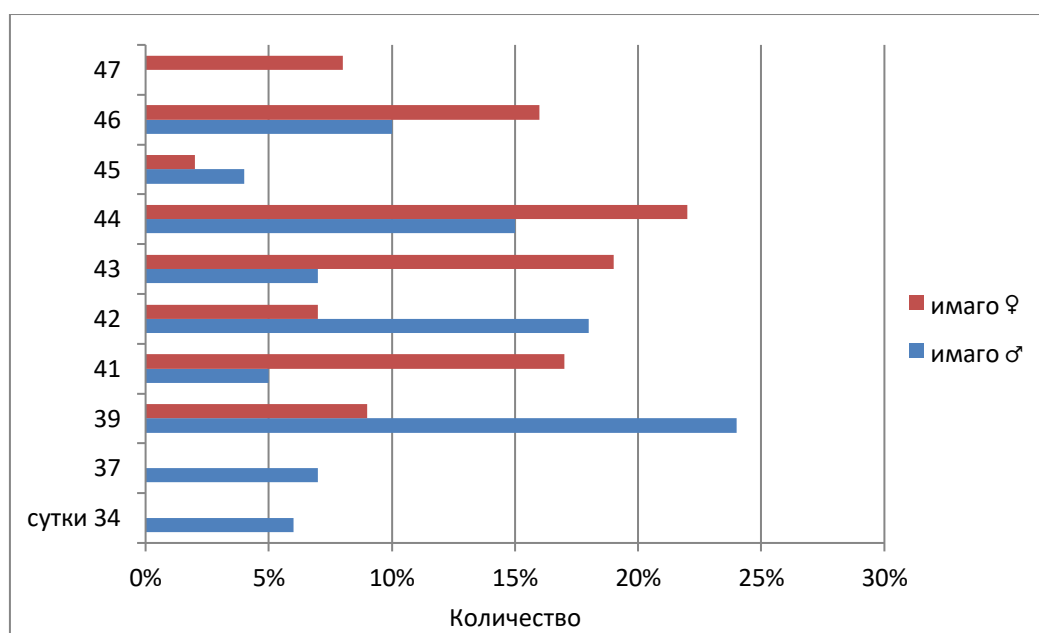


Рисунок 6. Получение имаго НШ, %

Таблица 2

Культивирование НШ, шт

Повторность	Количество яиц	Количество имаго	Плодовитость, кол-во яиц на 1♀
1	1000	100	266±25
2	1000	97	250±10
3	1000	85	200±17
4	1000	120	320±13
5	1000	93	285±27
Среднее	-	99±11	264±38

Согласно данным табл. 2 количество имаго в экспериментах варьировало в диапазоне от 85 до 120 особей. Этот показатель составляет до 12 % от активированных тысячи яиц НШ. Безусловно, процесс получения имаго является наиболее трудоемким этапом при культивировании НШ и нуждается в дальнейшей интенсификации исследовательской работы. Отрождаемость яиц составила 80-85 %, что является достаточным показателем для использования полученного потомства для культивирования в лабораторных условиях.

Для создания энтомопатогенных препаратов необходимы вирусные штаммы с высокой биологической активностью. Повышение активности штаммов возможно посредством пассирования с использованием метода массового отбора. На первом этапе пассирования ВЯП штамма НШ-07 в течение 5 пассажей при индивидуальном заражении личинок IV возраста дозой 1×10^5 пз/гус. отбирали гусениц, погибших в течение 9 сут от момента заражения, и выделяли из них вирус, который использовали для следующего пассажа. На втором этапе снижали дозу заражения личинок НШ IV возраста до 1×10^4 и на протяжении 4 пассажей отбирали гусениц по тому же принципу. На третьем этапе инфицировали личинок V возраста дозой 1×10^4 и для каждого следующего инфицирования отбирались гусеницы, погибшие от полиэдроза на 7-10 сут после заражения при предыдущем инфицировании. В результате использования метода массового отбора активность ВЯП штамма НШ-07 стала на 60 % выше, чем у наиболее активного аналога (штамма НШ-2-85).

Для сравнения чувствительности гусениц НШ к ВЯП штамм НШ-07 и штамм НШ-2-85 были поставлены соответствующие эксперименты. Данные приведены в табл. 3. В целом динамика гибели личинок у двух штаммов схожа, но штамм ВЯП НШ-07 имеет в среднем преимущество в 5-15 %, что показывает его большую эффективность в борьбе с НШ.

В табл. 4 представлены данные по выходу вируса при использовании штаммов ВЯП НШ-2-85 и ВЯП НШ-07.

Таблица 3

Данные биологической активности штаммов вирусов ВЯП НШ

Наименование штамма	$\lg(\text{ЛД}_{50})$	ЛВ_{50} , ч
НШ-07	$2,2 \pm 0,2$	216 ± 18
НШ-2-85	$2,6 \pm 0,2$	264 ± 15

Таблица 4

Выход вируса ядерного полиэдроза на 1 особь

Номер повторности	Доза ВЯП НШ-2-85, пэ на 1 особь, $\times 10^5$	Выход ВЯП НШ-2-85, пэ на 1 особь, $\times 10^9$	Доза ВЯП НШ-07, пэ на 1 особь, $\times 10^5$	Выход ВЯП НШ-07, пэ на 1 особь, $\times 10^9$
1	10	0,7	1	1,6
2	100	1,2	1	1,8
3	100	0,3	1	2,4
Среднее	-	$0,7 \pm 0,2$	-	$1,9 \pm 0,4$

При использовании штамма ВЯП НШ-07 выход вируса с 1 особи повышается практически в 2,5 раза (табл. 4), что показывает значительно более высокую продуктивность нового штамма по отношению к штамму ВЯП НШ-2-85, а значит и большую эффективность.

Проведенные нами исследования показали (рис. 7), что в определенном интервале концентраций бактериальный и вирусный компоненты действуют синергически, взаимно усиливая действие друг друга. Эффективность вирусной суспензии в низких концентрациях в дозах 100-1000 полиэдров на гусеницу невелика, за 14 сут наблюдения гибло 12-16 % гусениц. Аналогичный эффект оказывала бактериальная суспензия в дозе 3×10^3

спор/гус. Тогда как под воздействием композиции агентов динамика гибели гусениц существенно отличалась. Уже в первые 6 сут погибло от 46 до 56 % гусениц. Суммарный эффект чистых монопрепаратов в тех же концентрациях в среднем вызвал гибель лишь 14 % гусениц. При использовании композиции очевидным образом проявлялся синергический эффект: гусеницы начинали гибнуть раньше, чем в варианте с чистым вирусом, а количество погибших гусениц на 14 сут наблюдения приблизительно в 3 раза больше (86-92 %), чем суммарный эффект монопрепаратов в тех же концентрациях (26-30 %). Таким образом, комбинация компонентов в указанных концентрациях действует значительно эффективнее, чем сумма независимых компонентов.

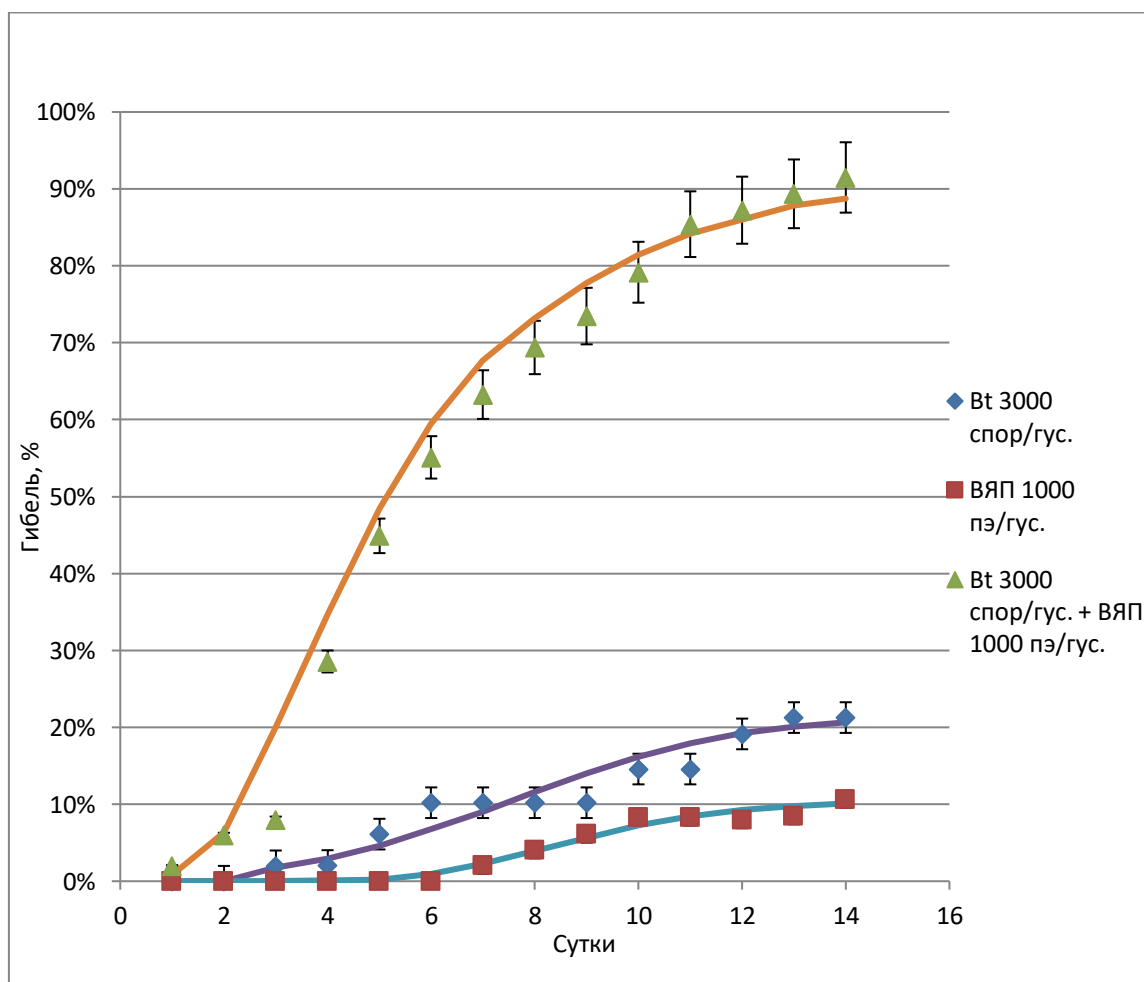


Рисунок 7. Динамика гибели непарного шелкопряда после заражения вирусным и бактериальным агентом, а также их композицией, %

Для определения эффективности использования смешанной инфекции в естественных условиях были проведены полевые эксперименты с

использованием вирусно-бактериальной смеси. На первом этапе был выявлен очаг размножения НШ в районе с. Шебалино (Республика Алтай) и определена площадь (она составила 20 га), на которой необходимо было провести защитные меры, чтобы не допустить разрастания этого очага.

На момент проведения защитных мероприятий на отобранных участках гусеницы НШ приступили к активному питанию и достигли II-III возраста. В связи с этим повреждения листьев берез и хвои лиственниц стали достаточно заметны. Обработка проводилась 4 июня 2017 г. с 20 до 22 ч наземным способом с использованием аэрозольной установки ГАРД (с расходом 3 л на 1 га) на базе автомобиля Урал.

Сохранность листвы в кронах деревьев оценивалась на заранее выбранных учетных пунктах и контрольных участках через 1 месяц после проведения обработки. На каждом учетном пункте анализировали степень объедания листвы не менее чем на 50 деревьях и находили среднюю степень объедания крон. Такой же учет осуществляли на контрольных участках, на котором меры защиты не были проведены.

Непосредственно на участках, на которых проводилась интродукция, гусеницы НШ отсутствовали, и степень объедания листвы составляла от 0 % до 10 %. На контрольных участках объедание листвы составило 50 – 70 %, также обнаруживались гусеницы и куколки НШ. Защитный эффект от проведенных лесозащитных мер составил от 40 % до 65 % (табл. 5).

Также была проведена обработка 1 га березовых колков в Кыштовском районе НСО в конце мая 2019 г. Был получен схожий эффект с обработкой в окрестностях с. Шебалино. Концентрация действующих агентов была та же, однако гусеницы НШ на момент обработки достигли I-II возраста и еще не успели переместиться в кроны деревьев. Таким образом, оказались более чувствительны к воздействию биоинсектицида. Защитный эффект составил около 70 %.

Наши исследования показали, что новое комплексное средство защиты растений, основанное на совместном использовании *Bacillus thuringiensis* и

ВЯП, обеспечивает высокий уровень гибели гусениц НШ в течение короткого промежутка времени.

Таблица 5

Расчет защитного эффекта проведенных мероприятий с использованием данных по дефолиации, %

Степень дефолиации			Защитный эффект
Повторность	На защищенном участке	На контрольном участке	
1	10	50	40
2	0	60	60
3	5	70	65
Среднее	5±5	60±11	55±15

Проведенные полевые эксперименты подтвердили, что применение смешанных инфекций для контроля численности НШ позволяет снизить численность данного вредителя до экологически незначимого уровня и не допустить дефолиации лесных массивов. Необработанные участки леса, расположенные на расстоянии более 1 км от места проведения эксперимента, значительно пострадали от объедания листвы НШ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ научных публикаций позволяет заключить, что в настоящее время начинается новый подъём в области изучения карантинных насекомых и исследования бакуловирусов для создания экологически безопасных инсектицидов, как за рубежом, так и в нашей стране. Полученные в рамках НИР экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности этого подхода. В настоящее время в мире разработано и применяется более 15 вирусных биопрепаратов для контроля численности насекомых-вредителей.

Для широкой коммерциализации биопрепаратов с вирусным, действующим началом необходимо решение многих проблем таких как: совершенствование технологий, расширение ассортимента препаратов, их оптимизация, наращивание объемов производства, улучшение техники применения, механизация и автоматизация процессов, разработка оборудования и новых инженерных решений. Современный уровень исследований позволяет в нашей стране осуществлять самостоятельное производство биопестицидов этого класса, не прибегая к импорту.

Массовое разведение насекомых необходимо для энтомологических исследований, получения биопрепаратов и других задач. В данной работе представлены актуальные подходы к культивированию необходимого насекомого – НШ, которые потенциально можно в определенной степени экстраполировать на родственные виды карантинных насекомых, к примеру, сибирский шелкопряд или шелкопряд-монашенка, ивовая волнянка. Это вносит значительный вклад в изучение жизненного цикла и особенностей жизнедеятельности насекомых-вредителей. Нами проведена работа по повышению биологической активности штамма ВЯП и оценен выход вируса при использовании нового штамма. Полученные результаты демонстрируют оправданность поиска возможностей для повышения продуктивности того или иного агента биологической борьбы. Установлено, что совместное применение композиций из различных энтомопатогенов, несмотря на пониженные концентрации до двух порядков, дают стойкий защитный эффект не только в лабораторных, но и в полевых условиях. Значимость представленных исследований для НСО не вызывает сомнений по экологическим и экономическим причинам. Так как ареал обитания НШ охватывает практически весь регион, и даже на текущий момент сформировал вспышки массового размножения на севере области в Венгеровском, Чановском и Кыштовском районах, то регулярное применение химических средств защиты растений будет являться неблагоприятным для экологической обстановки субъекта. Ввиду того, что гусеницы НШ

развиваются асинхронно, любые препараты, используемые для обработок, кроме вирусных должны использоваться многократно в течение полевого сезона. Только вирусные инсектициды формируют достаточно стойкие эпизоотии, чем могут снижать количество обработок, а тем самым экономические потери.

В настоящее время есть все предпосылки для организации производства препаратов на основе бакуловирусов: огромная потребность в инсектицидах этого типа, законченные научно-технические работы, развита система прогнозирования, имеется опыт создания композиций энтомопатогенов, показана экономическая эффективность вирусных препаратов и их перспективность. Поэтому создание технологии производства на основе биологических агентов является одной из важнейших задач современности.

ВЫВОДЫ

1. Создана новая ИПС для культивирования НШ, которая позволила сократить сроки достижения целевого (III) возраста для гусениц НШ на 3,5 сут. Подобраны оптимальные физические условия культивирования НШ: температура $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; влажность $70\% \pm 6\%$; фотопериод 16/8 ч; плотность содержания в чашках Петри не более 10 особей, начиная со II возраста.

2. В лабораторных условиях получены имаго и кладки НШ. Сформированы резервы биологического материала в количестве 12000 яиц.

3. Разработаны нормативные документы на процесс культивирования гусениц НШ и заражения ВЯП.

4. Доказана высокая патогенность ВЯП НШ штамм НШ-07 для гусениц НШ не только в лабораторных ($ЛВ_{50}=216\text{ ч}$, $ЛД_{50}=1,6 \times 10^2\text{ пэ/гус.}$), но и в полевых условиях (защитный эффект 40-65 %).

5. Показано, что применение композиции ВЯП НШ штамм НШ-07 и *Bacillus thuringiensis* приводит к сокращению сроков гибели насекомых –

ЛВ₅₀ 5 сут. Уменьшен расход агентов для *Bacillus thuringiensis* в 100 раз (с 5×10^7 спор/мл до 3×10^5 спор/мл) и для ВЯП НШ с 10^7 пэ/мл до 10^5 пэ/мл в сравнении с моно препаратами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

Колосов А.В., Охлопкова О.В., Моисеева А.А., Кузнецов В.Е., Дручинина А.В., Томилов А.А. Использование комбинированных инфекций для контроля численности насекомых-вредителей // Защита и карантин растений. – 2019. – № 9 – С. 49–51.

Охлопкова О.В., Колосов А.В., Ананько Г.Г., Кузнецов В.Е., Дручинина А.В. Применение смешанных инфекций для сдерживания численности непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2019. – № 3(78) – С. 99–104.

Патенты

Патент «Штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L., используемый для получения инсектицидного препарата», авторы: Колосов А.В., Моисеева А.А., Охлопкова О.В., Сафатов А.С. Номер патента 2662960, опубл. в бюл. № 22 от 31.07.2018 г.;

Патент «Искусственная питательная среда для культивирования гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.)», авторы: Охлопкова О.В., Моисеева А.А., Колосов А.В., Кузнецов В.Е., Дручинина А.В., Томилов А.А. Номер патента 2019108934, дата подачи заявки 27.03.2019 г., положительная экспертная оценка.

Нормативная документация

СОП № 2-029 «Приготовление искусственной питательной среды для культивирования гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.)»;

СОП № 2-030 «Определение биологической активности вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.)»;

СОП № 2-031 «Культивирование гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) на искусственной питательной среде»;

СОП № 2-032 «Культивирование имаго непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) в лабораторных условиях».