

ВПЛИВ *METARHIZIUM ANISOPLIE* НА ЯЙЦЯ ПАВУТИННОГО КЛІЩА *TETRANYCHUS URTICAE*

Чабанюк Я.В., Бровко І.С., Подгурська І.О., Куденко А.В.

ТОВ «Інститут агробіології»

бульв. Вацлава Гавела, 4, 03067, м. Київ

agrobiology@gmail.com

Стаття присвячена пошуку діючого агента проти павутинного кліща. Боротися з цим шкідником надзвичайно складно через його неймовірну плодовитість – за сезон він дає до 12 поколінь. У роботі розглянуто сучасні методи боротьби з *Tetranychus urticae*; встановлено, що більшість аграріїв віддає перевагу хімічним (піретроїдам та органофосфатам на основі мелатіону, піриміфос-метилу) і біологічним препаратам (авермектиновмісним речовинам, препаратам на основі *Bacillus thuringiensis*, інтродукції на заражену культуру хижого кліща, який харчується видом *Tetranychus urticae*), які впливають на дорослих особин кліща, але при цьому ніяк не діють на етапі яйця. Крім того, використання хімічних засобів має негативні наслідки: накопичуються в навколишньому середовищі, знищують корисну мікробіоту, сприяють появі резистентних шкідливих організмів. Розглянуто життєвий цикл павутинного кліща. Продемонстровано актуальність створення біопрепаратів на основі ентомопатогенних грибів. У роботі було проведено дослідження ентомопатогенної активності п'яти моноспорових ізолятів із різними культурально-морфологічними особливостями. Проаналізовано механізм дії мікроскопічного гриба *Metarhizium anisopliae*. Досліджено вплив конідиальної суспензії мікрміцета *Metarhizium anisopliae* з концентрацією $1 \cdot 10^8$, $2 \cdot 10^7$, $4 \cdot 10^6$ конідій/мл на яйця павутинного кліща. З'ясовано, яка з концентрацій спорового матеріалу є найбільш оптимальною під час визначення властивостей досліджуваного мікрміцета. Встановлено, що під час обробки яєць павутинного кліща вилуплення не відбувалось протягом перших трьох днів за обробки будь-яким із виділених ізолятів. Встановлено, який із виділених ізолятів володіє найбільшою акарицидною дією. Обґрунтовано практичне та теоретичне значення результатів дослідження під час розроблення сучасних біологічних препаратів з акарицидною дією на основі ентомопатогенних грибів – паразитів *T. urticae*. **Ключові слова:** життєвий цикл, павутинний кліщ, ентомопатоген, ізоляти, конідії, культура, препарат, *Metarhizium anisopliae*, міцелій, інкубація, популяція.

Effect of *Metarhizium anisopliae* on the spiders eggs of mite *Tetranychus urticae*. Chabaniuk Ya., Brovko I., Podhurska I., Kudenko A. The article is dedicated to finding the active agent against spider mites. The combat with this pest is extremely hard because of its incredible fertility – for a season it gives up to 12 generations. Modern methods of fighting with *Tetranychus urticae* have been developed, and it has been established that more agrarians prefer to use chemical (melaton-based pyrethroids and organophosphates, pyrimiphos-methyl) and biological (avermectin-containing substances, preparations based on *Bacillus thuringiensis*, introduction to the infected culture of a predatory tick that feeds on the species *Tetranychus urticae*) preparations, which effect on adult tick, but not on the egg stage. In addition, the use of chemicals have negative consequences: they accumulate in the environment, destroy the beneficial microbiota, contribute to the emergence of resistant harmful organisms. Consider the tick lifecycle. The urgency of the creation of biological products based on entomopathogenic fungus. As a result, an entomopathogenic activity study was performed using monospore isolates with different cultural and morphological resources. The mechanics of the *Metarhizium* microscopic fungus was analyzed. The effect of conidial suspension of *Metarhizium anisopliae* micromycetes with concentration of $1 \cdot 10^8$, $2 \cdot 10^7$, $4 \cdot 10^6$ conidia/ml on eggs of spider mite was investigated. The optimal concentration of the spore materials was discovered during researches the properties of the micromycetes. It was found that processing of mite spider eggs with any isolated isolate stops the hatching for first three days. It was discovered which isolate has the higher acaricidal influence. The practical and theoretical significance of the research results in the development of modern biological preparations with acaricidal action based on the entomopathogenic fungi – *T. urticae* parasites are substantiated. **Key words:** life cycle, pavutinous mites, entomopathogen, isolations, conidia, culture, preparation, *Metarhizium anisopliae*, mycelium, incubation, population.

Постановка проблеми. Павутинний кліщ, або *Tetranychus urticae*, – один із найпоширеніших і найнебезпечніших шкідників культурних рослин нашої кліматичної зони. Така майже непомітна для неозброєного ока комаха завдає величезних економічних збитків як під час вирощування рослин у відкритому ґрунті, так і для тепличних господарств. Кліщ здатний інфікувати широкий спектр сільськогосподарських культур – овочеві, бобові, фруктові дерева та декоративні квіти.

Особливої гостроти проблема зараження павутинним кліщем набуває для рослин сої. Перші про-

яви кліща на рослинах можуть з'являтися ще на початку червня, як тільки температура повітря досягає 29–31°C, а вологість не перевищує 35–55%, що збігається з фазами розвитку сої цвітіння – формування бобів. У таких сприятливих умовах павутинний кліщ може досягати чисельності 2–3 особи на трійчастий листок до цвітіння і перевищувати показник у 10 особин – у період формування і наливу зерна. Зовнішніми ознаками зараження культури сої кліщем є білі плями на листовій поверхні, які добре просвічуються на сонці. З часом плями зливаються, утворюючи мармуровий орнамент, згодом

листя жовтіє і опадає. Це відбувається тому, що кліщі харчуються соком рослини, внаслідок чого порушується фотосинтез. При цьому зростає випаровування води, відбувається втрата хлорофілу та порушення функцій листового апарату. Культура передчасно дозріває, формуючи меншу кількість бобів, що негативно впливає на врожайність.

Життєвий цикл кліща включає в себе 5 стадій розвитку комахи – яйце, личинка, дві стадії німфи та доросла особина – імаго. Тривалість циклу від яйця до дорослої особини суттєво залежить від температури. За оптимальних умов (близько 27°C) павутинний кліщ завершує свій розвиток від 5 до 20 днів. За рік комаха може давати величезну кількість генерацій, що перекриваються між собою. Доросла самка живе від двох до чотирьох тижнів і здатна відкласти кілька сотень яєць протягом життя. Кліщ чудово почувається в спекотну, суху погоду в літню та осінню пору, але осередки зараження кліщем можуть з'являтися в будь-яку пору року. Самки кліща можуть переживати зиму всередині ґрунту або під корою дерев.

Побачити кліща зазвичай можна з нижнього боку листа, який затягнутий тонкою павутинкою. Він має вигляд маленької чорної або червоної цятки, яка рухається по листку. Боротися з цим шкідником надзвичайно складно через його неймовірну плодовитість – за сезон він дає до 12 поколінь. На жаль, більшість препаратів не знищує яйця шкідника, тому необхідно проводити обробку в кілька етапів різними хімічними препаратами, діючі речовини яких вибірково знищують кліща на різних етапах розвитку.

Актуальність дослідження. Сучасні аграрії використовують як хімічні, так і біологічні методи боротьби з *Tetranychus urticae* [1; 2]. Асортимент препаратів хімічного синтезу включає в себе піретроїди та органофосфати на основі мелатіону, піриміфос-метилу. Біологічні препарати представлені авермектиновмісними речовинами та препаратами на основі *Bacillus thuringiensis*, також поширеним способом боротьби є інтродукція на заражену культуру хижого кліща, який харчується видом *Tetranychus urticae*. Проблемою всіх цих препаратів є те, що вони впливають лише на дорослих особин кліща, не завдаючи при цьому шкоди шкіднику на етапі яйця. Унаслідок цього виникає потреба в багатократних обробках зараженої культури, що, у свою чергу, завдає економічних та екологічних збитків. Ба більше: діючі речовини хімічних акарицидів можуть бути причиною виникнення резистентності шкідника до ряду препаратів, після чого боротьба з павутинним кліщем ще більше ускладнюється.

Альтернативою використанню традиційних способів боротьби з популяціями павутинного кліща на культурі сої є створення мікробних препаратів на основі ентомопатогенних грибів – паразитів *Tetranychus urticae*. У боротьбі проти павутинного кліща найкраще зарекомендували себе

мікроміцети виду *Metarhizium anisopliae*, які є внутрішніми паразитами кліщів цього роду. Механізм дії мікроскопічного гриба *Metarhizium* полягає не лише в проростанні його конідій всередині кліща, а й у продукуванні ним екзогенних токсинів, які виділяються під час зараження тіла хазяїна. Гриб проникає в організм павутинного кліща через кутикулу, що складається з білків, хітину та ліпідів: *Metarhizium anisopliae* має високу ферментативну активність, яка допомагає йому з легкістю подолати цей бар'єр і проникнути всередину тіла хазяїна.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. В останні роки проблема боротьби з кліщами рослин стає більш актуальною. Велика кількість публікацій присвячена порівнянню дій хімічних акарицидів. Наприклад, у публікації [3] проаналізовано досить широкий спектр інсектоакарицидів і встановлено їхню ефективність під час застосування проти звичайного павутинного кліща на смородині чорній. Велика кількість публікацій присвячена негативним наслідкам під час використання хімічних засобів: вони мають здатність накопичуватися в навколишньому середовищі, знищують корисну мікробіоту, сприяють появі резистентних шкідливих організмів [4–6]. Для пошуку альтернатив синтетичним хімічним інсектицидам для боротьби зі шкідниками Каїрський університет (Єгипет) займався дослідженням контролю популяції *Tetranychus urticae* Koch за допомогою ефірних масел: ромашки, майорану та евкаліпта [7]. Нині роботи, що стосуються пошуку дієвих препаратів проти павутинного кліща, тривають. У пріоритеті – розроблення ефективних препаратів із тривалим терміном дії.

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Незважаючи на велику кількість досліджень і публікацій щодо цієї проблеми, в Україні досі не проводились дослідження та пошук діючої речовини проти *Tetranychus urticae* на стадії яйця.

Новизна. Вирішення цього питання робить внесок у контроль над популяцією цього шкідника і має велике значення для розвитку аграрної сфери та садівництва.

Методологічне або загальнонаукове значення. Проведене дослідження є підґрунтям для розроблення ефективного біопрепарату з метою вирішення проблеми боротьби з павутинним кліщем.

Виклад основного матеріалу. Мікробіологами Інституту агробіології було проведено спрямований пошук і відбір ізолятів природного штаму *Metarhizium anisopliae* з метою виділення ізоляту з найвищими показниками акарицидної активності проти павутинного кліща. Під час роботи було виділено 25 моноспорових ізолятів із різними культурально-морфологічними особливостями та відібрано 5 із них із найкращими ростовими характеристиками.

Ізоляти зберігалися на скошеному агарі за температури -72°C та були відновлені на середовищі

ГПДА (глюкоза 4 г, пептон 1 г, дріжджовий екстракт 1 г, агар 2 г в 100 мл води) в чашках Петрі. Штами мікроміцета вирощували за 25°C протягом 7 днів і використовували для утворення повітряного міцелію. Повітряний міцелій *Metarhizium anisopliae* вирощувався на середовищі з рису, приготованому на пару. Рисову культуру кожного ізоляту, який було інокульовано два дні на рідкому поживному середовищі ГПДА, інкубували в чашках Петрі (діаметром 15 см) за 25°C протягом 6–9 днів, після чого висушували за 35°C протягом 48 год. Міцелій збирали через вібраційне сито. Отриманий міцелій висушували до вмісту води близько 5% за кімнатної температури у вакуумній сушарці, після чого одразу використовували для отримання біопроб.

Для отримання популяції павутинного кліща в лабораторних умовах окремі особини виду *Tetranychus urticae* були виділені з природного агроценозу сої сорту Моравія у Вінницькій області та поміщені в умови ростової камери на рослини сої за температури 23±2°C. Щоб отримати яйця *Tetranychus urticae* одного віку, 20 дорослих жіночих особин було довільно взято з лабораторних рослин і переміщено на окрему листову поверхню з кореневими волосками, які ростуть із черешка, на 1,5% агар у чашках Петрі (діаметром 9 см). Самки мали можливість вільно відкладати яйця протягом 18 год. Як наслідок, після вилучення самок на листовій поверхні залишалося 30–65 яєць на листок для подальших досліджень. Окремі листки штучно підтримували в жит-

тездатному стані більше 15 днів, щоб дати можливість нормального виводу яєць кліща.

Під час проведення дослідження впливу *Metarhizium anisopliae* на яйця павутинного кліща конідії гриба розбавляли дистильованою водою, яка містила Tween 80, та отримували три суспензії з концентрацією 1·10⁸, 2·10⁷, 4·10⁶ конідій/мл.

Встановлено, що всі з досліджуваних суспензій мали однаковий ефект, тому було прийнято рішення для подальшого дослідження використовувати суспензію з концентрацією 2·10⁷ конідій/мл. Для дослідження властивостей кожного з ізолятів гриба, яйця *Tetranychus urticae* на окремих листках (3–4 шт.) у чашках Петрі поміщали на дно ємності та обприскували приготованою суспензією конідій відповідного ізоляту протягом 15–20 сек. Після обприскування чашки Петрі з яйцями накривали кришкою та поміщали в термостат для підтримання температури 25°C та вологості 90%. Щодня проводився візуальний контроль за моментом вилуплення яєць на чашках Петрі. У всіх варіантах, окрім контролю, яйця не вилуплювалися протягом трьох днів із моменту обприскування (рис. 1).

Аналізуючи одержані дані, робимо висновок, що летальний ефект на яйця кліщів значно відрізняється серед ізолятів *M. anisopliae*. Кожен ізолят різною мірою пригнічував розвиток яєць шкідника. Найбільшою акарицидною дією володів ізолят № 1, який пригнічував розвиток яєць *T. urticae* протягом усього досліджуваного періоду (спостерігалось

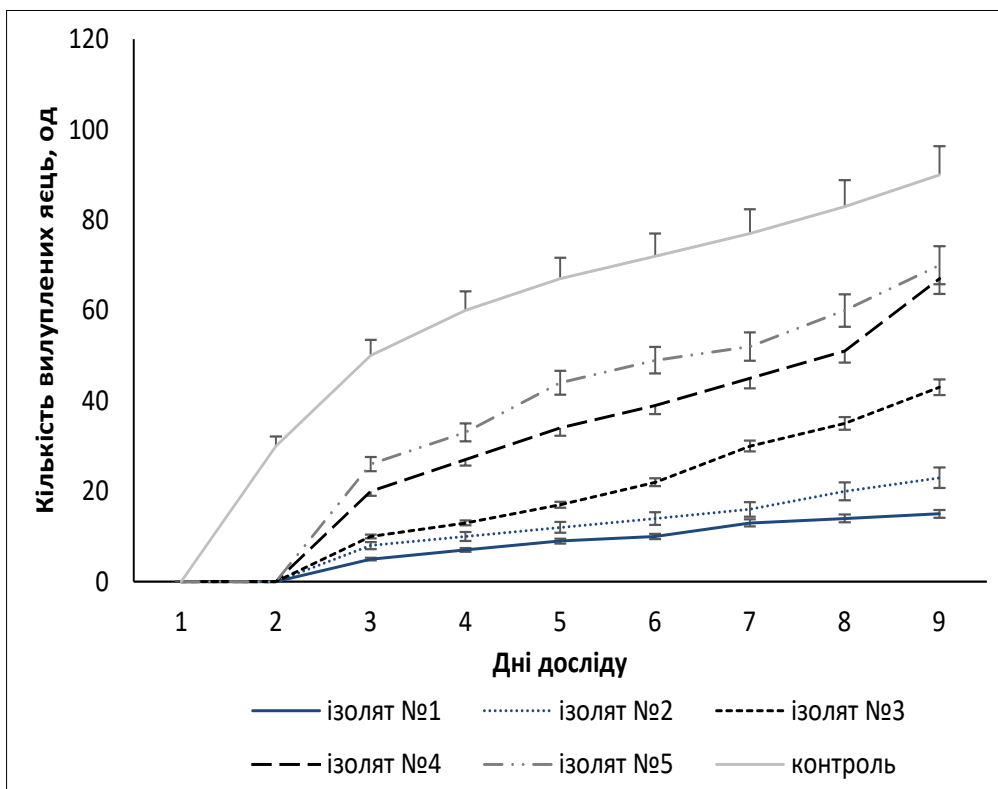


Рис. 1. Вплив моноспорових ізолятів *M. anisopliae* на життєздатність *T. urticae*

вилуплення 16 яєць *T. urticae* проти 91 яйця в контрольному варіанті на 9 день проведення досліду). Дещо меншою ефективністю вирізнялися ізоляти №№ 2, 3 (18 та 34 вилуплених яйця відповідно). Ізоляти №№ 4, 5 проявили найменшу акарицидну дію – 64 і 67 яєць кліща змогли розвиватися на листі сої після застосування відповідних зразків штамів *M. anisopliae*.

Дія біоконтрольних агентів на яйцях *T. urticae* відрізняється від дії щодо незрілих або дорослих кліщів. Яйця кліщів мають малий розмір, тому дуже важливим було перемістити їх без пошкоджень – ушкоджені яйця для проведення аналізу не підходять.

Щоб мінімізувати артефакти, всі яйця, використані в цьому дослідженні, були відкладені в природних умовах. Відокремлене листя сої розміщували на агарі в чашках Петрі, крім грибового щеплення, більше жодної обробки не проводилось.

Найбільше труднощів виникало під час визначення способу підрахунку мертвих яєць, загибель яких спричинена грибовою інфекцією після обприскування. На відміну від активних незрілих і дорослих стадій павутинного кліща, яйця нерухомі, а це ускладнювало визначення їхнього рівня смертності. Невеликі зміни в морфології яєць, такі як форма і колір, були недостатніми для оцінки смертності.

Отже, яйця, за якими спостерігали в день обприскування, не можна було класифікувати як мертві чи

живі до появи грибка. На щастя, підрахунок вилуплених яєць виявився досить показовим. Крім того, показники вилуплення можна використовувати для оцінки смертності яєць під час оцінки дії різної концентрації конідій, тобто дані біологічних аналізів можна інтерпретувати для співвідношення «концентрація – смертність».

Головні висновки. Пошук і дослідження біоагентів, які мають акарицидні властивості, залишаються досить актуальними. Пріоритетним постає питання пошуку агента, який діє на стадію яйця в життєвому циклі *T. urticae*. У статті досліджено та встановлено, який із виділених моноспорових ізолятів *M. anisopliae* має найбільший летальний ефект щодо яєць павутинного кліща. Також з'ясовано, яка з концентрацій спорового матеріалу є найбільш оптимальною під час визначення властивостей досліджуваного мікроміцета.

Перспективи використання результатів дослідження. Завдяки дослідженню акарицидних властивостей ізольованих варіантів *M. anisopliae* встановлено, що деякі з них є досить ефективними в боротьбі проти шкідників сої – павутинних кліщів. Результати досліджень мають практичне та теоретичне значення під час розроблення сучасних біологічних препаратів з акарицидною дією на основі ентомопатогенних грибів – паразитів *T. urticae*.

Література

1. Лагутенко О.Т., Пархоменко О.В. Основи сільського господарства: методичні рекомендації до проведення навчально-польової практики. Київ : НПУ ім. М.П. Драгоманова, 2013. 46 с.
2. Марков І.Л. Інтегрований захист сої від хвороб. *Агроном*. 2013. № 2. С. 152–159.
3. Бакалова А.В. Ефективність застосування інсектоакарицидів при захисті смородини чорної від акариформних кліщів в агроекологічних умовах Центрального Полісся України. *Збірник наукових праць Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків*. 2012. Вип. 14. С. 126–131. URL: <http://nbuv.gov.ua/UJRN>.
4. Гадзало Я.М. Агробіологічне обґрунтування інтегрованого захисту ягідних насаджень від шкідників у Південно-Західному Лісостепу і Поліссі України : автореф. дис. ... д-ра с.-г. наук. Київ, 1999. 32 с.
5. Трибель С.О. Стійкі сорти. Зменшення енергоємності і втрат врожаїв від шкідників. *Насінництво*. 2006. № 4. С. 18–20.
6. Фокина В.Д., Покровская С.Ф. Природоохранные аспекты химизации сельского хозяйства. Москва, 1983. 70 с.
7. Afify Abd El-Moneim M.R., Ali Fatma S., Turky A.F. Control of *Tetranychus urticae* Koch by extracts of three essential oils of chamomile, marjoram and eucalyptu. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012. Jan., 2 (1). P. 24–30.