

Joanna MATUSKA-ŁYŻWA¹

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA I ROZRODCZOŚĆ NICIENI ENTOMOPATOGENNYCH WYBRANEJ AGROCENOZY

BIOLOGICAL ACTIVITY AND REPRODUCTIVITY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES FROM SELECTED AGROCOENOSE

Abstrakt: Przeprowadzono badania faunistyczne w celu stwierdzenia obecności nicieni z rodziny *Steinernematidae*. Próbkę glebową pobrano z terenu użytku zielonego położonego w gminie Wieluń (województwo łódzkie). Długość i szerokość geograficzną stanowiska występowania gatunku oznaczono za pomocą programu komputerowego Gnomon. Próbkę została zbadana pod względem fizykochemicznym w Centrum Analitycznym SGGW. Oznaczono całkowitą zawartość ołowiu w glebie metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS) oraz odczyn gleby metodą potencjometryczną (wg procedury PB 14, wyd. 2 z 21.06.06 r.). Nicienie wyizolowano z próbek glebowych w warunkach laboratoryjnych metodą Beddinga i Akhursta. *S. feltiae* oznaczono za pomocą klucza do oznaczania gatunku oraz za pomocą analiz chemicznych. Wykazano, że nicienie pochodzące z badanego terenu charakteryzują się większą aktywnością biologiczną (intensywność inwazji, stopień migracji) oraz dłuższym czasem rozwoju (czas uśmiercenia żywiciela i czas niezbędny do rozpoczęcia migracji) w porównaniu z nicieniami pochodzącymi z komercyjnego biopreparatu.

Słowa kluczowe: nicienie entomopatogenne, *Steinernema feltiae*, *Galleria mellonella*

Nicienie entomopatogenne występujące w glebie często spotykają się z naturalnym oporem środowiska, ograniczającym ich aktywność biologiczną. Na zdolność inwazji nicieni oraz ich skuteczność w ograniczaniu populacji owadów wpływa wiele czynników biotycznych i abiotycznych [1-4].

Kluczowymi czynnikami abiotycznymi są: struktura środowiska glebowego, odczyn gleby oraz znajdujące się w niej metale ciężkie. Przykładem może być ołów(II), którego szkodliwe oddziaływanie na nicienie entomopatogenne stwierdzono wielokrotnie [5-9].

Na aktywność biologiczną nicieni wpływa także odczyn gleby [10]. Optymalne pH środowiska glebowego dla wielu organizmów w nim występujących zawiera się w zakresie 5,5÷7,2 [11]. Wykazano, że obniżenie odczynu gleby wpływa niekorzystnie na przeżywalność i inwazyjność larw nicieni [10, 12].

Struktura środowiska glebowego także może mieć znaczący wpływ na nicienie owadobójcze. W podłożach piaszczystych i piaszczysto-gliniastych notuje się największą przeżywalność i aktywność tych zwierząt [13].

Nicienie te są także organizmami, które wykorzystuje się do produkcji biopreparatów. Dane naukowe sugerują, że wybór środków z rodzimych ras nicieni jest korzystniejszy niż zastosowanie komercyjnych preparatów na bazie jednej określonej rasy tych organizmów. Badania tego typu są przeprowadzane w wielu krajach na świecie, m.in. na Węgrzech [14, 15]. W Polsce natomiast brakuje szczegółowych badań, danych biogeograficznych, kolekcji

¹ Zakład Zoologii i Dydaktyki Biologii, Instytut Biologii, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce, tel. 41 349 63 53, email: joannaujk@op.pl

użytecznych gatunków czy ras nicieni entomopatogennych skutecznie ograniczających populacje szkodliwych owadów.

Niniejsza praca prezentuje charakterystykę aktywności biologicznej nicieni odłowionych ze środowiska naturalnego w porównaniu z nicieniami pochodzącymi z komercyjnego biopreparatu.

Materiał i metody

Przeprowadzono badania faunistyczne w celu stwierdzenia obecności nicieni z rodziny *Steinernematidae*. Próbki glebowe pobrano sondą Egnera do głębokości 25 cm, z terenu użytku zielonego (łąka kośna) położonego w gminie Wieluń (województwo łódzkie). Długość (18°40'36") i szerokość (51°14'24") geograficzną stanowiska występowania gatunku wyznaczono za pomocą programu komputerowego Gnomon. Próbki zostały zbadane pod względem fizykochemicznym w Centrum Analitycznym SGGW. Oznaczono całkowitą zawartość ołowiu w glebie metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS) oraz odczyn gleby metodą potencjometryczną (wg procedury PB 14, wyd. 2 z 21.06.06 r.).

Do przeprowadzonych badań jako żywiciela wykorzystano gąsienice barciaka większego (*Galleria mellonella* L.) o średniej masie ciała 187 mg oraz larwy nicieni entomopatogennych *Steinernema feltiae*, odłowione z próbek glebowych w warunkach laboratoryjnych metodą owadów pułapkowych [16]. Gatunek nicienia oznaczono za pomocą klucza do oznaczania [17] oraz analiz molekularnych (sekwencjonowanie produktu reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do genów kodujących rybosomalny RNA *S. feltiae*). Jako próbę kontrolną wykorzystano *S. feltiae*, pochodzące z preparatu biologicznego „Owinema”.

Badania prowadzono na szalkach Petriego w temperaturze 20°C. Do zarażania owadów wykorzystano dawkę 50 larw inwazyjnych nicieni na jednego owada (optymalna dawka do otrzymania maksymalnej liczby larw nicieni [18]) w celu zbadania śmiertelności owadów, ekstensywności i intensywności inwazji.

W doświadczeniu wykorzystano około 400 sztuk gąsienic *G. mellonella*, które przeznaczono na izolację nicieni z próbek glebowych, na sekcję (analiza intensywności inwazji) oraz na analizę rozrodczości nicieni. Parametr ten badano przez pięć kolejnych dni od momentu pierwszego pojawienia się larw inwazyjnych w sztucznym środowisku zewnętrznym (szalka Petriego). Oceniono liczbę wszystkich larw, które zdołały opuścić ciało żywiciela w danym dniu oraz liczbę larw żywych (zdolnych do kolejnych inwazji).

Do analizy statystycznej wykorzystano analizę wariancji jednej zmiennej (UNIANOVA). Doświadczenie powtórzono dwukrotnie.

Wyniki i ich omówienie

Przeprowadzona analiza fizykochemiczna próbek glebowych wykazała naturalną zawartość ołowiu(II) (6,86 ppm) oraz odczyn kwaśny (5,62). Podgrupę granulometryczną gleby określono jako glina piaszczysta. Wartości wymienionych powyżej wybranych parametrów określają środowisko jako odpowiednie do występowania nicieni owadobójczych. Znajduje to także potwierdzenie w wynikach innych badaczy [6, 12, 13].

W analizowanych próbkach glebowych stwierdzono obecność larw nicieni entomopatogennych, a przeprowadzone pomiary morfometryczne wszystkich stadiów rozwojowych nicieni i przyrównanie ich do klucza wykazały, że badane nicienie należą do gatunku *S. feltiae*. Otrzymany wynik potwierdziła także przeprowadzona reakcja PCR. Odłowiony gatunek należy do najliczniejszej populacji nicieni występującej na terenie Polski [1, 19].

Analizując aktywność biologiczną nicieni wykazano, że śmiertelność ogólna owadów testowych poddanych zarażeniu nicieniami pochodzącymi z terenu, utrzymywała się na takim samym poziomie jak próbka kontrolna (nicienie z biopreparatu). Ekstensywność inwazji badanych nicieni była nieco niższa w porównaniu z próbką kontrolną, jednak wartość ta świadczy nadal o dużej skuteczności nicieni występujących naturalnie w środowisku wobec owadów (tab. 1).

Tabela 1

Aktywność biologiczna *S. feltiae*

Table 1

Biological activity of *S. feltiae*

Badane próbki	Próbka kontrolna	Nicienie z terenu
Śmiertelność ogólna owadów [%]	100	100
Ekstensywność inwazji [%]	100	98
Intensywność inwazji [szt.]	8	9
Czas uśmiercenia owada przez nicienie [dni]	2	4
Pierwszy dzień migracji larw inwazyjnych z owada-żywiciela do środowiska zewnętrznego [dni]	8	18

Intensywność inwazji nicieni odłowionych z terenu charakteryzowała się nieco wyższą wartością niż próbka kontrolna, a przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotne różnice między kontrolą a nicieniami pochodzącymi z terenu (tab. 2).

Tabela 2

Analiza wariancji dla cechy „intensywność inwazji”

Table 2

Variance analysis for „invasion intensity” feature

Źródło zmienności	Typ III sumy kwadratów	df	Średni kwadrat	F	Istotność
Model skorygowany	166,667(a)	1	166,667	13,758	,000
Stała	17888,267	1	17888,267	1476,694	,000
Środowisko	166,667	1	166,667	13,758	,000
Błąd	2883,067	238	12,114		
Ogółem	20938,000	240			
Ogółem skorygowane	3049,733	239			

(a) - *R* kwadrat = 0,055 (skorygowane *R* kwadrat = 0,051)(a) - *R* square = 0.055 (corrected *R* square = 0.051)

Badając czas, po jakim dochodziło do śmierci gąsienic po zarażeniu nicieniami (czas uśmiercenia owada - żywiciela), stwierdzono, że w przypadku próbki nicieni pochodzących z terenu był on dłuższy niż w próbce kontrolnej (tab. 1). Czas ten jest również niewiele dłuższy, niż podają inni badacze [18, 20].

Podobne zależności zanotowano, analizując czas niezbędny do rozpoczęcia migracji larw inwazyjnych z ciała żywiciela do środowiska zewnętrznego. Pierwszy dzień, w którym zaobserwowano obecność larw w środowisku zewnętrznym, odnotowano w 18 dniu od zarażenia, natomiast w przypadku nicieni z próbki kontrolnej do migracji dochodziło już w 8 dniu od zarażenia owada (tab. 1).

Wyniki czasu uśmiercenia owada i czasu niezbędnego do rozpoczęcia migracji mogą świadczyć o selektywności pokarmowej nicieni środowiskowych.

Analizując rozrodność nicieni pochodzących z terenu oraz przeżywalność ich larw bezpośrednio po migracji zaobserwowano, że liczba żywych larw, które zdołały opuścić ciało owada-żywiciela, jest wyższa niż w populacji nicieni z próbki kontrolnej (tab. 3, rys. 1). Śmiertelność larw nicieni z terenu w ciągu pierwszych pięciu dni migracji była mniejsza w porównaniu z próbką kontrolną oraz cechowała się mniejszą dynamiką niż śmiertelność larw nicieni pochodzących z bioinsektycydu (tab. 3, rys. 2).

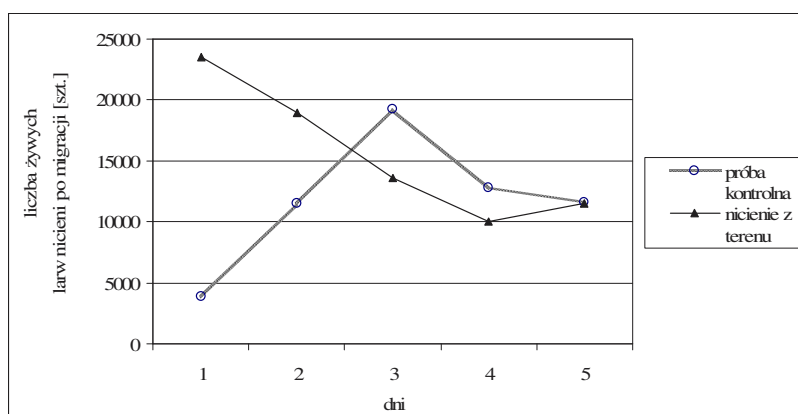
Tabela 3

Migracja nicieni z pierwszego i czterech kolejnych dni z wyszczególnieniem liczby larw żywych [szt.]

Table 3

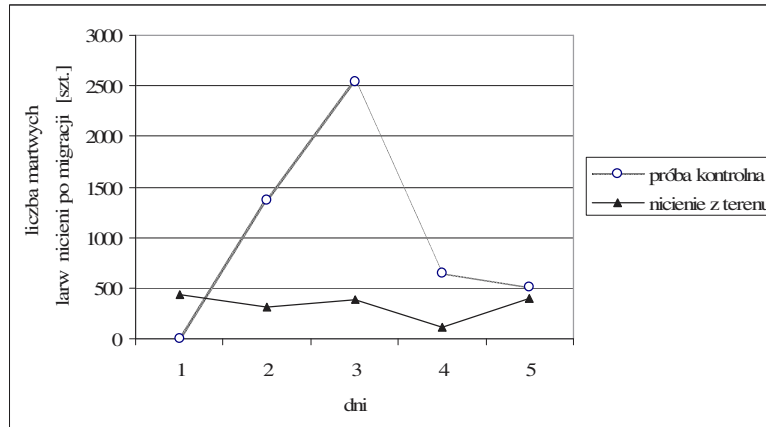
Nematodes migration in the first and next successive four days
with specification of the amount of alive larvae [ind.]

Dni	Liczba migrujących larw/ 1 owada			
	próba kontrolna		nicienie z terenu	
	ogółem	żywe	ogółem	żywe
1	3829	3829	23917	23483
2	12886	11517	19286	18979
3	21795	19251	13951	13559
4	13403	12756	10167	10052
5	12096	11586	11932	11532
Razem	64009	58940	79254	77605



Rys. 1. Liczba żywych larw inwazyjnych nicieni po migracji [szt.]

Fig. 1. Amount of the alive invasive larvae of nematodes after migration [ind.]



Rys. 2. Liczba martwych larw inwazyjnych nicieni po migracji [szt.]

Fig. 2. Amount of the dead invasive larvae of nematodes after migration [ind.]

Analiza statystyczna liczby larw inwazyjnych, które zachowały żywotność po migracji z ciał owadów, wykazała wysoko istotne różnice między badanymi niciansiami a próbką kontrolną (tab. 4).

Tabela 4

Analiza wariancji dla cechy „rozrodczość nicieni”

Table 4

Variance analysis for „nematodes reproductivity” feature

Źródło zmienności	Typ III sumy kwadratów	df	Średni kwadrat	F	Istotność
Model skorygowany	712663381,125(a)	1	712663381,125	7777,256	,000
Stała	37407552526,125	1	37407552526,125	408226,569	,000
Środowisko	712663381,125	1	712663381,125	7777,256	,000
Błąd	549805,750	6	91634,292		
Ogółem	38120765713,000	8			
Ogółem skorygowane	713213186,875	7			

(a) - R kwadrat = 0,999 (skorygowane R kwadrat = 0,999)

(a) - R square = 0.999 (corrected R square = 0.999)

Badania nad aktywnością biologiczną nicieni pochodzących ze środowiska naturalnego są nadal w fazie rozwoju. Wykazano, że jednym z najskuteczniejszych patogenów przeciwko szkodnikom (np. pędrakom chrabąszcza) są nicienie entomopatogenne wyizolowane z terenu [21]. Otrzymane wyniki badań również dowodzą, że nicienie pochodzące ze środowiska naturalnego cechują się większą rozrodczością i żywotnością larw inwazyjnych niż nicienie pochodzące z biopreparatu. Istotne jest kontynuowanie i rozszerzenie tematu badań, który w przyszłości mógłby skutkować lepszym wykorzystaniem biologicznych metod ochrony roślin.

Wnioski

1. Odłowiony gatunek *S. feltiae* należy do najbardziej rozpowszechnionego na obszarze Polski.
2. Nicienie pochodzące z terenu charakteryzują się większą aktywnością biologiczną (intensywność inwazji, stopień migracji) niż nicienie z biopreparatu.
3. Czas rozwoju (uśmiercenia żywiciela i czas niezbędny do rozpoczęcia migracji) nicieni odłowionych z terenu jest dłuższy niż nicieni wykorzystywanych do produkcji preparatów biologicznych.

Literatura

- [1] Yadav AK, Lalramliana. Soil moisture effects on the activity of three entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) isolated from Meghalaya, India. *J Parasit Dis.* 2012;36(1):94-98, DOI: 10.1007/s12639-011-0076-x.
- [2] Mason JM, Hominick WM. The effect of temperature on infection, development, and reproduction of Heterorhabditids. *Journal of Helminthology.* 1995;69(4):337-345, DOI: 10.1017/S0022149X00014929.
- [3] Koppenhofer AM, Fuzy EM. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *J Invertebr Pathol.* 2006;92(1):11-22, DOI: 10.1016/j.jip.2006.02.003.
- [4] Toledo J, Williams T, Pérez C, Liedo P, Valle JF, Ibarra JE. Abiotic factors affecting the infectivity of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) on larvae of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology.* 2009;19(9-10):887-898, DOI: 10.1080/09583150903180429.
- [5] Jarmuł J, Kamionek M. Survival and migration abilities of *S. feltiae* Filipjev in a habitat contaminated by lead ions. *Ecol Chem Eng.* 2003;10(3-4):281-284.
- [6] Jarmuł J. Wpływ jonów ołowiu i kadmu na nicienie entomopatogeniczne *Steinernema feltiae* Filipjev. Praca doktorska. Warszawa: SGGW; 2002, 130.
- [7] Jarmuł J, Kamionek M. Effect of Lead Compounds on the Intensity and Extend of Infection of *Galleria mellonella* L. Caterpillars by Entomopathogenic Nematodes *Steinernema Feltiae* Filipjev. *Ecol Chem Eng.* 2001;8(6):601-607.
- [8] Jaworska M, Gorczyca A, Sepioł J, Tomasik P. Oddziaływania metal - metal w układach biologicznych. Synergizm i antagonizm triad jonów metali w owadobójczych nicieniach *Steinernema carpocapsae*. *Ecol Chem Eng.* 2000;7(4):313-326.
- [9] Jaworska M, Gorczyca A, Sepioł J, Tomasik P. Effect of metal ions on the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae) under laboratory conditions. *Water Air Soil Pollut.* 1997;93(1-4):157-166.
- [10] Kung SP, Gaugler R, Kaya HK. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. *Nematol.* 1990;22(4):440-445.
- [11] Stuczyński T, Siebielec G, Maliszewska-Kordybach B, Smreczak B, Gawrysiak L. Wyznaczanie obszarów, na których przekroczone są standardy jakości gleb. Biblioteka Monit Środow. Warszawa: IOŚ; 2004:17-18.
- [12] Jaworska M. i Dudek B.: Występowanie owadobójczych nicieni w glebach wybranych upraw. *Zesz Nauk Akad Roln Kraków.* 1992;20:131-147.
- [13] Kaya HK. Soil Ecology. In: Gaugler R, Kaya HK, editors. *Entomopathogenic nematodes in biological control.* Boca Raton, FL: CRC Press; 1990; 93-115.
- [14] Tóth T. Collection of entomopathogenic nematodes for biological control of insect pests. *J Fruit Ornament Plant Res.* 2006;14(3):225-230.
- [15] Lakatos T, Tóth T. Biological control of European cockchafer larvae (*Melolontha melolontha* L.): Preliminary results. *J Fruit Ornament Plant Res.* 2006;14(3):73-78.
- [16] Bedding RA, Akhurst RJ. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica.* 1975;21(1):109-110.
- [17] Lacey LA. *Manual of Techniques in Insect Pathology.* New York: Academic Press (Elsevier); 1997; 288-294.

- [18] Skrzypek H. Rozrodczość nicieni entomofilnych w różnych warunkach zagęszczenia populacji. Praca doktorska. Lublin: Katolicki Uniwersytet Lubelski; 1987, 91.
- [19] Dziągiewska M, Myśków B, Adamska I, Czerniawska B. Seasonal Dynamics of the Activity of Entomopathological Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Selected Greens of Szczecin. *Ecol Chem Eng.* 2012;19(6):601-607.
- [20] Kamionek M. Reakcje owadów na inwazję nicieni oraz inwazje mieszane grzybów i nicieni owadobójczych. Praca doktorska. Warszawa: SGGW; 1976, 34.
- [21] Szostak H. Wojna nicienia z pędrakiem. *Echa Leśne.* 2001;11:22-24.

BIOLOGICAL ACTIVITY AND REPRODUCTIVITY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES FROM SELECTED AGROCOENOSE

Department of Zoology and Biological Didactics, Institute of Biology, Faculty of Mathematics and Science
The Jan Kochanowski University in Kielce

Abstract: Faunistic studies to find the presence of nematodes of the family *Steinernematidae* were performed. Soil samples were collected from pasture area located in the municipality of Wielun (Lodz province). Latitude and longitude of the sampling site was determined with the Gnomon software. Physico-chemical properties of samples were analyzed in the Analytical Centre of the Warsaw Agricultural University. Total lead content was analyzed with the flame atomic absorption spectrophotometry and soil pH - potentiometrically (acc. to procedurer pB 14, II edition of 21.06.2006). Nematodes were isolated from the soil samples in the laboratory conditions, using method described by Bedding and Akhurst (1975). *S. feltiae* were determined using the key for the determination of the species (Lacey 1997) and by molecular analysis. It was shown that nematodes from the investigated area were characterized by higher biological activity (the intensity of the invasion, the degree of migration) and longer duration of development (time of killing the host and the time needed to start migration), in comparison with nematodes from commercial biopreparate.

Keywords: entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae*, *Galleria mellonella*