

BADANIA NAD MOŻLIWOŚCIĄ PRZETRWANIA W GLEBIE LARW
INWAZYJNYCH Z RODZAJÓW *PRISTIONCHUS* I *NEOAPLECTANA*

ALICJA FEDORKO

Dział Ekologii Stosowanej Zakładu Ekologii PAN, Warszawa

Nicienie z rodziny *Diplogasteridae* i *Steinernematidae*, facultatywne pasożyty owadów, posiadają w swoim cyklu rozwojowym charakterystyczne przystosowania. Takim przystosowaniem m.in. jest tworzenie larw inwazyjnych, zwanych też przez niektórych autorów larwami przetrwalnikowymi lub larwami kiwającymi („Dauerlarven”, „Winkenlarven”), gdyż w pewnych warunkach przy przegęszczeniu larwy te podnoszą górną część ciała i wykonują ruchy wahadłowe lub okrężne w poszukiwaniu jakiegoś punktu oparcia, do którego natychmiast przywierają, odrywając się od podłoża. Nazwa larwy przetrwalnikowe wskazuje na inne ciekawe przystosowania tych larw, mianowicie zdolność przetrzymywania, bez przechodzenia w następne stadium, warunków niesprzyjających, w których inne stadia larwalne oraz postacie dorosłe nicieni skazane są na zagładę [1, 2]. Dla introdukcji w terenie jest to bardzo istotna cecha, na tym więc stadium jako najbardziej przystosowanym do znoszenia niespodzianek przyrody chcę skupić uwagę.

Dotychczasowe badania w naszym laboratorium entomonematologicznym doprowadziły do opanowania metody szybkiej produkcji larw inwazyjnych z rodzajów *Pristionchus* i *Neoaplectana*. Ustalono też, zdający egzamin i w miarę wygodny sposób magazynowania i długiego przechowywania żywych, zdolnych do infekcji larw w dowolnych, sprawdzonych zagęszczeniach (od kilkudziesięciu tysięcy larw inwazyjnych do pół miliona i więcej na mililitr zawiesiny). Larwy te przechowuje się w bardzo słabych roztworach formaliny w niskich temperaturach (0,001% roztwór w 5°C) [3]. Następną fazą badań, których celem jest zastosowanie praktyczne nicieni w zwalczaniu szkodników roślin, musi być opracowanie sposobów introdukcji tych larw w terenie. Wstępem do tego są badania nad zachowaniem się larw inwazyjnych w środowiskach, których warunki są zbliżone do naturalnych. Należy znaleźć odpowiedź na pytanie, jaki jest najwłaściwszy termin, sposób oraz warunki introdukcji nicieni w terenie. W tym celu należy poznać tolerancję gatunku na wahania temperatury i wilgotności oraz jego możliwości przetrwania długiego okresu zi-

mowego. Aby otrzymać odpowiedź na niektóre z tych pytań, założono następujące doświadczenia. W plastikowych cylindrach o pojemności 420 ml umieszczono, uprzednio wysterylizowaną glebę, do której domieszano zawiesinę larw inwazyjnych w ilości 1000 larw na 1 ml gleby. Do doświadczenia użyto larw *Pristionchus uniformis* i *Neoaplectana carpocapsae*.

W przypadku pierwszego gatunku larwy w pierwszym wariantie pochodziły bezpośrednio z hodowli, w drugim wariantie były użyte larwy przechowywane przez 3-miesięczny okres w 0,001% roztworze formaliny; larwy *N. carpocapsae* wzięto do doświadczenia tylko z populacji przechowywanej przez 3 miesiące w 0,001% roztworze formaliny. Cylindry z zawartością zostały umieszczone w skrzyniach z wysterylizowaną glebą na głębokości takiej, że brzeg cylindra wystawał ok. 3 cm ponad powierzchnię. Skrzynie umieszczono na betonie na odsłoniętej przestrzeni 3 listopada przy temperaturze powietrza +9°C. W okresie listopada, grudnia i stycznia temperatura spadała okresowo do -12°, -15°C, a dwukrotnie nocą wynosiła -19°C. Notowano w tym czasie wielokrotne opady, najpierw deszczu, potem śniegu, a następnie znowu deszczu. Przez okres tygodnia powierzchnia ziemi w skrzyniach pokryta była lodem, przemieszanym ze śniegiem, a ziemia w skrzyniach zamarznięta aż do dna.

Po 3 miesiącach przeprowadzono analizę gleby pobranej z cylindrów (po 25 ml z cylindra) i otrzymano następujące wyniki. Najlepiej zniosły ten okres larwy *P. uniformis* pobrane do doświadczenia bezpośrednio z hodowli. Najgorzej larwy *N. carpocapsae* (tab. 1). W ciągu następnego 3-miesięcznego okresu, w którym prowadzono doświadczenie, temperatura wahała się początkowo od -6°C do +8°C, następnie wzrosła w końcowej fazie doświadczenia do +18°C. W tym okresie panowała dwutygodniowa bezchmurna pogoda, w czasie której ziemia w cylindrach zupełnie wyschła.

W pierwszych dniach maja przeprowadzono analizę całej gleby w cy-

Tabela 1

Przeżywanie larw inwazyjnych w glebie

Rodzaj larw inwazyjnych wziętych do doświadczeń	Liczba larw w 1 ml gleby			Przeżywalność w %	
	na początku doświadczenia	po 3 mie- siącach	po 6 mie- siącach	po 3 mie- siącach	po 6 mie- siącach
<i>P. uniformis</i> larwy przechowywane w roztworze formaliny	1000	82	9	8,2	0,9
<i>P. uniformis</i> larwy bezpośrednio z ho- dowli	1000	105	17	10,5	1,7
<i>N. carpocapsae</i> larwy przechowywane w formalinie	1000	63	6	6,3	0,6

lindrach, celem sprawdzenia stopnia przeżycia larw inwazyjnych. Wyniki są przedstawione w tabeli 1. Stwierdzono, że mimo bardzo niekorzystnych warunków, jakie nieczęsto spotyka się w terenie, gdzie rzadko występuje całkowite zamarzanie lub wysychanie głębokich warstw gleby, przeżyła dosyć duża liczba nicieni: w przypadku larw *N. carpocapsae* ponad 2500 larw w jednym cylindrze, natomiast larw *P. uniformis* (wziętych do doświadczeń bezpośrednio z hodowli) do 7000 w jednym cylindrze.

Celem sprawdzenia, czy larwy te zachowały zdolność porażania owadów, przeprowadzono doświadczenia z zakażaniem larw *Tribolium castaneum*. Do zakażenia użyto larw z 3 wariantów przeprowadzonego doświadczenia i wziętych bezpośrednio z hodowli oraz larw przechowywanych w słabym roztworze formaliny.

Uzyskane wyniki wskazują, że larwy przetrzymywane przez 6 miesięcy w ziemi, w bardzo niekorzystnych warunkach, nie tylko nie straciły zdolności porażania, lecz nawet nieznacznie zwiększyła się szybkość zabijania przez nie owadów. Najlepiej uwidacznia się to na przykładzie larw *P. uniformis* przechowywanych w słabym roztworze formaliny. Larwy te bezpośrednio po wyjęciu z roztworu działały wolniej i dawały wyniki słabsze, natomiast po przetrzymaniu przez 6 miesięcy w ziemi porażały owady równie szybko i skutecznie jak larwy użyte bezpośrednio z hodowli. Wyniki porażania *T. castaneum* przedstawia tabela 2.

Tabela 2

Śmiertelność larw *Tribolium castaneum* porażanych przez nicienie

Gatunek nicienia	Seria	Śmiertelność w % po		
		48 godz.	72 godz.	96 godz.
<i>P. uniformis</i>	a	33	40	60
	b	85	85	100
	c	80	100	—
	d	93	100	—
<i>N. carpocapsae</i>	a	80	100	—
	b	80	86	93*
Kontrola		15	—	23

a — larwy inwazyjne wzięte do doświadczeń po 3-miesięcznym przechowywaniu w roztworze 0,001% formaliny;
b — larwy inwazyjne przetrzymane przez 3 miesiące w roztworze 0,001% formaliny, a następnie przez 6 miesięcy w glebie;

c — larwy inwazyjne bezpośrednio z hodowli;

d — larwy inwazyjne wzięte bezpośrednio z hodowli a następnie przetrzymane przez 6 miesięcy w glebie.

* Część *T. castaneum* zostało porażone grzybami.

Powyższe doświadczenia dają podstawę do twierdzenia, że introdukcja odpowiedniej ilości larw inwazyjnych do gleby umożliwia utrzymanie się ich przez dłuższy okres czasu, a nawet po bardzo niekorzystnej zimie, zachowanie odpowiedniej ilości larw zdolnych do porażania owadów w następnym okresie wegetacyjnym.

Przeprowadzone w terenie badania i obserwacje wykazały, że na niektórych polach 15⁰/₀, a nawet więcej zimującej stonki jest niszczone przez nicienia *P. uniformis*. Zaprojektowano cykl doświadczeń nad możliwościami podwyższenia tej redukcji poprzez wprowadzenie wczesną jesienią, w czasie schodzenia stonki do gleby, larw inwazyjnych tego gatunku nicienia. Uzyskane wyniki przeżywania larw w glebie pozwalają spodziewać się pozytywnych rezultatów.

STRESZCZENIE

Dotychczasowe badania w naszym laboratorium entomonematologicznym doprowadziły do opanowania metody szybkiej produkcji larw inwazyjnych z rodzajów *Pristionchus* i *Neoaplectana*. Ustalono też zdający egzamin i w miarę wygodny sposób magazynowania i długiego przechowywania żywych, zdolnych do infekcji larw w dowolnych, sprawdzonych zagęszczeniach. Larwy te przechowuje się w bardzo słabych roztworach formaliny w niskich temperaturach (0,001⁰/₀ roztwór w 5°C). Należy znaleźć odpowiedź na pytanie, jaki jest najwłaściwszy termin, sposób i warunki introdukowania nicieni w terenie.

Aby otrzymać odpowiedź na niektóre z tych pytań, założono następujące doświadczenia. W plastikowych cylindrach o pojemności 420 ml umieszczono, uprzednio wysterylizowaną glebę, do której domieszano zawiesinę larw inwazyjnych w ilości 1000 larw na 1 ml gleby. Do doświadczeń użyto larw *Pristionchus uniformis* i *Neoaplectana carpocapsae*. W przypadku pierwszego gatunku larwy w pierwszym wariantcie pochodziły bezpośrednio z hodowli, w drugim wariantcie były użyte larwy przechowywane przez 3-miesięczny okres w 0,001⁰/₀ roztworze formaliny; larwy *N. carpocapsae* wzięto do doświadczeń tylko z populacji przechowywanej przez 3 miesiące w takich samych warunkach. Cylindry z zawartością zostały umieszczone w skrzyniach z wysterylizowaną glebą na głębokości takiej, że brzeg cylindra wystawał ok. 3 cm ponad powierzchnię. Skrzynie umieszczono na betonie na odsłoniętej przestrzeni 3 listopada przy temperaturze powietrza +9°C. W okresie listopada, grudnia i stycznia temperatura spadała okresowo do -12°, -15°C, a dwukrotnie nocą wynosiła -19°C.

Po 3 miesiącach przeprowadzono analizę gleby pobranej z cylindrów (po 25 ml z cylindra) i otrzymano następujące wyniki. Najlepiej zniosły ten okres larwy *P. uniformis* pobrane bezpośrednio z hodowli. Najgorzej larwy *N. carpocapsae*. W ciągu następnego 3-miesięcznego okresu, w którym prowadzono doświadczenia, temperatura wahała się początkowo od -6° do +8°C, następnie wzrosła w końcowej fazie doświadczenia do +18°C. W tym okresie panowała dwutygodniowa bezchmurna pogoda, w czasie której gleba w cylindrach zupełnie wyschła.

W pierwszych dniach maja przeprowadzono analizę całej gleby w cy-

lindrach. Stwierdzono, że mimo bardzo niekorzystnych warunków przeżyła dość duża liczba nicieni: w przypadku larw *N. carpocapsae* ponad 2500 larw w jednym cylindrze, natomiast larw *P. uniformis* (wziętych do doświadczeń bezpośrednio z hodowli) do 7000 w jednym cylindrze.

Celem sprawdzenia, czy larwy zachowały zdolność porażania owadów, przeprowadzono doświadczenia z zakażaniem larw *Tribolium castaneum*. Do zakażenia użyto larw z 3 wariantów przeprowadzonego doświadczenia, wziętych bezpośrednio z hodowli oraz larw przechowywanych w słabym roztworze formaliny. Uzyskane wyniki wskazują, że larwy przetrzymywane przez 6 miesięcy w ziemi, w bardzo niekorzystnych warunkach, nie tylko nie straciły zdolności porażania lecz nawet nieznacznie zwiększyła się szybkość zabijania przez nie owadów.

Powyższe doświadczenia dają podstawę do twierdzenia, że introdukcja odpowiedniej ilości larw inwazyjnych do gleby umożliwia utrzymanie się ich przez dłuższy okres czasu, a nawet po bardzo niekorzystnej zimie, zachowanie odpowiedniej ilości larw zdolnych do porażania owadów w następnym okresie wegetacyjnym.

PIŚMIENNICTWO

1. Bovien P.: 1937, Vidensk Medd. dansk naturh. Foren. 101, 1-114.
2. Nikles O. P.: 1967, Mitt. biol. BundAnst. 124, 1-40.
3. Sandner H., Stanuszek S.: 1966, Insect Path. microbiol. Control Amsterdam VI/4, 210-212.

Алиция Федорко

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОХРАНЕНИЯ В ПОЧВЕ ИНВАЗИОННЫХ ЛИЧИНОК РОДОВ *PRISTIONCHUS* И *NEOAPLECTANA*

Краткое содержание

Проведенные энтонематологической лабораторией исследования дали возможность разработки быстрого метода разведения инвазионных личинок родов *Pristionchus* и *Neoaplectana*. Разработано тоже довольно удобный способ магазинирования и длительного хранения живых способных к инфекции личинок определенной, любой плотности (от нескольких тысяч личинок до полумиллиона и больше в одном миллилитре суспензии). Личинки эти выдерживаются в очень слабом растворе формалина и хранятся в пониженной температуре (0,001% раствор при 5°C).

Для того чтобы ответить на вопрос о наиболее правильном сроке, способе и условиях интродукции нематод в полевых условиях, надо знать толерантность вида к колебаниям температуры и влажности, а также возможность сохранения его во время длительного зимнего периода. С целью выяснения некоторых из этих вопросов были проведены следующие опыты. В цилиндры из пластмассы емкостью 420 мл помещали стерильную почву, к которой добавляли суспензию инвазионных личинок в количестве 1000 личинок на один мл почвы. Для опытов использовались личинки *Pristionchus uniformis* и *Neoaplectana carpocapsae*. В первом варианте с *P. uniformis* использовались личинки сразу после их разведения,

в другом варианте личинки хранимые в течение трёх месяцев в 0,001% растворе формалина. Личинки *N. carpocapsae* применили только из популяции хранимой 3 месяца в тех же условиях. Цилиндры с содержимым помещали в ящики со стерильной почвой на такую глубину, чтобы край цилиндра был выше на 3 см поверхности почвы. Ящики 3 ноября при температуре 9°C поместили на бетонной площадке в открытом месте. В ноябре, декабре и январе температура воздуха понижалась временно до -12 -15°C, а два раза ночью до -19. Многократно выпадали осадки сначала в виде дождя потом снега и снова дождя. В течение недели ящики были покрыты льдом перемешанным с замёрзшим снегом, а почва в ящиках промёрзла полностью. После трёх месяцев проведено анализ почвы отобранной из цилиндров (по 25 мл из цилиндра).

По данным этого анализа лучше всех выдержали этот период личинки *P. uniformis* внесённые в сосуды сразу после их разведения, а хуже личинки *N. carpocapsae*.

В течение следующих трёх месяцев опыта температуры воздуха колебались от -6 до +8°C и в дальнейшем возрастали до 18°C под конец опыта. В это время стояла тёплая безоблачная погода, во время которой почва в цилиндрах высохла полностью. В первых днях мая проведено анализ всей почвы из цилиндров для определения степени поражения инвазионных личинок.

Выявлено, что несмотря на очень неблагоприятные условия, которые не часто встречаются в практике, где редко имеет место замерзание или высыхание глубоких слоев почвы, в цилиндрах пережило довольно большое количество нематод — в варианте с *N. carpocapsae* свыше 2500 личинок, а в варианте со „свежими“ личинками *P. uniformis* до 7000 в одном цилиндре.

В дальнейшем для выяснения насколько личинки сохранили способность поражать насекомых проведено опыты с заражением личинок *Tribolium castaneum*. Для заражения применяли личинки из трёх вариантов проведенного опыта, личинки сразу после их разведения и личинки после хранения в растворе формалина. Полученные результаты указывают на то, что личинки выдерживаемые шесть месяцев в земле в очень неблагоприятных условиях не только не теряют способности к инфекции, но они даже незначительно быстрее убивают насекомых.

Представленные исследования позволяют сделать вывод, что интродукция определённого количества инвазионных личинок в почву даёт возможность хранения их довольно длительное время и сохранения достаточного количества даже в условиях очень неблагоприятной зимы и использования их для поражения насекомых в следующий вегетационный период.

Alicja Fedorko

STUDIES ON THE VIABILITY IN SOIL OF INVASIVE NEMATODE LARVAE OF THE GENERA *PRISTIONCHUS* AND *NEOAPLECTANA*

Summary

The studies so far carried out in our entomonematological laboratory have made it possible to perfect a method for rapid production of invasive larvae of the genera *Pristionchus* and *Neoaplectana*. A new method has been established for long-term storage of live larvae capable of infecting insects, at optional and tested densities, which has proved successful and reasonably convenient. These larvae are kept in a very weak formalin solution at low temperatures (0.001% solution at 5°C). It is necessary to find the answer as to what time, way and conditions for introducing nematodes into the area are most suitable.

The following experiments were set up in order to find the answer to some of these questions. Previously sterilized soil was placed in plastic cylinders of 420 ml capacity together with a suspension of invasive larvae with density of 1000 larvae per 1 ml of soil. Larvae of *Pristionchus uniformis* and *Neoaplectana carpocapsae* were used for the experiments. In the case of the first species the larvae in the first variant originated directly from the culture; in the second variant larvae were used which had previously been stored for 3 months in an 0.001% formalin solution. The *N. carpocapsae* larvae used for the experiments originated exclusively from a population kept for 3 months under the same conditions. The cylinders, together with their contents, were sunk in boxes containing sterilized soil to a depth at which the edge of the cylinder protruded about 3 cm above the surface. The boxes were placed on concrete in an exposed space on November 3 rd, when air temperature was +9°C. During the period from November to January temperature fell from time to time to -12° -15°C, and twice fell to -19°C at night.

After 3 months analysis was made of soil taken from the cylinders (25 ml from each cylinder) and the following results obtained. *P. uniformis* larvae taken directly from the culture withstood this period best, and *N. carpocapsae* larvae worst. During the next 3-month period in which the experiments were carried out temperature varied initially from -6°C to +8°C, then rose during the final phase of the experiment to 18°C. During this period there were two weeks of cloudless weather during which the soil in the cylinders dried up completely.

During the first days of May analysis was made of the whole of the soil in the cylinders in order to establish the degree of infection by invasive larvae.

It was found that despite the very unfavourable conditions a fairly large number of nematodes survived: in the case of *N. carpocapsae* over 2500 larvae in one cylinder, and for *P. uniformis* (taken directly from culture for the experiments) up to 7000 larvae in one cylinder.

In order to determine whether the larvae retained their capacity for invading insects experiments were made with infection of the larvae of *Tribolium castaneum*. Larvae from the three variants of the experiment were used for infection, that is, larvae taken directly from the culture and larvae kept in a weak formalin solution.

The results obtained indicate that larvae kept for 6 months in soil, under very unfavourable conditions, not only did not lose their capacity for infection but even slightly increased the rate at which they killed the insects.

The above experiments provide grounds for stating that the introduction of suitable numbers of invasive larvae into the soil makes it possible for them to survive for a long period of time, and even after a very harsh winter, to retain a suitable number of larvae capable to infecting insects during the next growing season.