

Федеральное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

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)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

канд. биол. наук

Алексей Владимирович Колосов

Кольцово – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
1. Обзор литературы.....	10
1.1. История развития прикладной энтомологии.....	10
1.2. Глобальные проблемы, связанные с насекомыми-вредителями.....	14
1.3. Современные биологические методы контроля численности насекомых-фитофагов.....	17
1.3.1. Насекомые-энтомофаги.....	18
1.3.2. Энтомопатогенные нематоды.....	20
1.3.3. Энтомопатогенные грибы.....	21
1.3.4. Энтомопатогенные бактерии.....	22
1.3.4.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
1.3.5. Энтомопатогенные вирусы.....	25
1.3.5.1. Семейство вирусов насекомых <i>Baculoviridae</i>	28
1.3.6. Комбинированные энтомопатогенные агенты.....	32
1.4. Обширный полифаг – непарный шелкопряд.....	35
1.5. Характеристика Новосибирской области как района обитания непарного шелкопряда.....	38
1.6. Динамика вспышек массового размножения непарного шелкопряда в Новосибирской области.....	39
1.7. Анализ современных подходов к культивированию непарного шелкопряда как основного звена в наработке вирусной биомассы.....	41
1.7.1. Факторы среды.....	44
1.7.2. Искусственные питательные среды.....	49
2. Материалы и методы.....	54
2.1. Материалы.....	54
2.2. Методы.....	54
2.2.1. Приготовление искусственных питательных сред.....	54

2.2.2. Определение микробного числа в сухих компонентах корма...	56
2.2.3. Методика культивирования гусениц непарного шелкопряда....	56
2.2.4. Методика культивирования имаго непарного шелкопряда.....	58
2.2.5. Вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда.....	58
2.2.6. Планирование экспериментов.....	64
2.2.7. Статистическая обработка данных.....	65
3. Результаты и обсуждение.....	66
Заключение.....	82
Выводы.....	84
Список литературы.....	85
Приложение А. Патенты.....	99
Приложение Б. Нормативная документация.....	104
Приложение В. Акты проведенных обследований и полевых испытаний.....	108

Список сокращений

АББ – американская белая бабочка

ВГ – вирус гранулеза

ВЦП – вирус цитоплазматического полиэдроза

ВЯП НШ – вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда

ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан

ИПС – искусственная питательная среда

ЛВ₅₀ – время, за которое погибает 50 % насекомых

ЛД₅₀ – доза вируса, вызывающая гибель 50 % насекомых

ЛД₉₀ – доза вируса, вызывающая гибель 90 % насекомых

МКТВ – Международный комитет таксономии вирусов

МПА – мясопептонный агар

НСО – Новосибирская область

НШ – непарный шелкопряд

ОС – озимая совка

ПВГ – полигеномный вирион

Пэ – полиэдры

СВК – супервирионный капсид

СОП – стандартные операционные процедуры

СПВК – суперполивирионный капсид

Т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

Bt – *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

Введение

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 (НШ): 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 НШ, использовались химические пестициды (Зинченко В.А., 2012), 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 (Максимова Ю.В., 2014).

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 (Ильиных А.В., 2007). Биометод включает в себя использование биопрепаратов, действующим компонентом которых могут быть биологические агенты, такие как вирусы, бактерии, простейшие и грибы (Гулий В.В. и др., 1981).

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 НШ, как наиболее актуального, карантинного фитофага для Сибирского федерального округа.

В настоящей работе использовали штамм ВЯП НШ-07, выделенный и идентифицированный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Штамм ВЯП НШ-07 обладает большей вирулентностью по отношению к НШ 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 НШ (температура, влажность, питание);
2. получение имаго и жизнеспособного потомства НШ для формирования лабораторных резервов данного биоматериала;
3. стандартизация, получаемых насекомых, посредством фиксации основных параметров;
4. исследование патогенности ВЯП НШ штамм НШ-07 по отношению к гусеницам НШ;
5. определение эффективности композиции вируса ядерного полиэдроза и *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* в лабораторных экспериментах и полевых испытаниях по контролю численности НШ.

Научная новизна

Полученные нами данные дополняют исследования особенностей онтогенеза карантинных насекомых, культивируемых в лабораторных условиях. Предложена новая ИПС для выращивания гусениц НШ. Оценена

скорость достижения целевого (III) возраста гусеницами НШ при культивировании на искусственных кормах. Получены актуальные данные по влиянию физических факторов на культивирование насекомых. Получен новый, более активный штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда (ВЯП НШ) и изучена чувствительность данных насекомых к нему. Предложены новые варианты комбинирования энтомопатогенных агентов для наиболее эффективного контроля численности НШ.

Практическая значимость

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

Положения, выносимые на защиту

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

При использовании новой ИПС 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 НШ 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 ВЯП штамма НШ-07 ЛВ₅₀ составляет 8 ± 1 сут, для штамма НШ-2-85 на 2 сут больше.

При использовании композиции ВЯП штамма НШ-07 с *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* достигнуты более короткие сроки наступления гибели НШ – 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 ВЯП НШ 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 Пущинская школа-конференция молодых ученых (г. Пущино, 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 ИПС, ежегодный сбор яйцекладок НШ, проведение обследований и полевых обработок в Кыштовском районе Новосибирской области, экспедиционная работа, участие в статистической обработке полученных результатов и написании нормативной документации.

1. Обзор литературы

1.1. История развития прикладной энтомологии

Энтомология – это раздел зоологии, объектом исследований которого являются насекомые. В эпоху Ренессанса энтомология получила масштабное развитие – были выполнены первые исследования по анатомии и метаморфозу насекомых. Еще в XVIII веке К. Линней в своей «Системе природы» обозначил насекомых, как важное звено в развитии биологии. Названия отрядов насекомых, которые предложил К. Линней, используются и сейчас. С XVIII века начался активный рост количества исследований, посвященных систематике насекомых. Работая над «Происхождением видов», Ч. Дарвин в подтверждении многих положений приводил примеры, связанные с насекомыми (Myers J.H., Rotman L., 1995; Андреева И.В., Джалилов Ф.С., 2004).

Особенно стремительно наука о насекомых стала развиваться в XX веке. В это время были достигнуты успехи не только в описании новых видов насекомых, изучении их географических ареалов, физиологии и анатомии, но и произошло становление такой области знаний, как прикладная энтомология. Активное развитие прикладной энтомологии в нашей стране было обусловлено необходимостью наращивания объемов производств в сельском и лесном хозяйствах. Значительный урон насекомые-вредители наносили техническим и зерновым культурам, овощеводству и лесным массивам. Особенно значительные потери нес юг страны, где массовое размножение саранчи, свекловичных долгоносиков, хлебного жука, НШ, златогузки, кольчатого шелкопряда привело к сильнейшей потере урожая. На западе страны негативное воздействие оказывал шелкопряд-монашенка. Повсеместно лесокультурные работы были осложнены увеличением количества вредителей (Бахвалов С.А., 1995).

Прикладная энтомология в 20-е годы XX века стала развиваться в таких основных направлениях, как лесном и сельскохозяйственном. В рамках лесной и сельскохозяйственной энтомологии изучались онтогенез, обитающих в лесах

и на полях, насекомых, взаимосвязи насекомых и растений, причины массовых размножений, приносимые вред и пользу для биоценоза и человека. Также исследовались болезни насекомых-фитофагов и другие меры борьбы с вредителями, в частности энтомофаги. Основной задачей прикладной энтомологии является научная разработка методов контроля численности насекомых-вредителей, которая возникла в связи с нуждами сельского и лесного хозяйств и служит научной основой, на которой развивается защита леса от насекомых-вредителей и болезней. Роль защиты растений от насекомых-вредителей является значимой, особенно, ввиду актуальности вопросов охраны природы и рационального природопользования (Злотин А.З., 1989).

Первые упоминания о повреждениях лесных массивов и сельскохозяйственных угодий насекомыми-вредителями и противодействия лесничих и других специалистов появились в начале XVIII века. Основные меры воздействия были обобщены и описаны в «Лесном журнале». В 1845 – 1851 гг. вышло руководство «О вредных насекомых», изданное Министерством государственного имущества Российской Империи. Руководство было первой сводкой по насекомым-вредителям, если не считать разрозненных, кратких данных. К концу XIX века было издано трехтомное сочинение Ф. Кеппена, в котором были освещены все имеющиеся материалы по данной тематике. Материалов относительно вредителей на тот момент накопилось достаточное количество, однако большая часть сведений о физиологии и систематике, также о мерах борьбы с насекомыми продолжали перениматься из опыта немецкого сельского и лесного хозяйств, где защита растений была на более прогрессивном уровне и существовала более продолжительный период времени (Кожурин С.И. и др., 2004).

Успехи в развитии защиты растений от насекомых-вредителей в нашей стране связаны с такими именами, как Н.А. Холодковского и И.Я. Шевырева, которые видели проблему, как с ее фундаментальной стороны, так и с прикладной. Н.А. Холодковский своими исследованиями сыграл решающую

роль в становлении теоретической основы данной науки. Он оставил исследования по сложному циклу хермесов, ряд работ по короедам, также изучал анатомию насекомых. Благодаря ему, было переведено на русский язык большое количество немецкой литературы, связанной с энтомологией, которая помогла освоить энтомологию с практической стороны. И.Я. Шевырев работал в Бюро по энтомологии департамента земледелия Российской Империи. Исследования И.Я. Шевырева отвечали на самые актуальные вопросы энтомологии того времени. Особо известными стали его работы по изучению короедов и степных вредителей.

Несмотря на все перечисленные исследования и большой интерес со стороны ученых, до Октябрьской социалистической революции работы по защите леса были лишены плановости. В большинстве они производились в государственных лесах и большой пласт территории, а, следовательно, и данных, оставался, не изучен. Большая часть работ по сбору данных и проб выполнялась натуралистами-любителями нерегулярно, что не могло положительно сказаться на полноте и достоверности результатов исследований.

После революции, в период перепланировки всего народного хозяйства начали проявляться заметные положительные сдвиги в области защиты растений. В этот период Управление лесами и сельхоз. угодьями Наркомата земледелия СССР организовало широкие экспедиции с целью изучения видового разнообразия вредителей на территории СССР, также повсеместно вводились штатные должности энтомологов. В этот период появился ряд значимых работ З.С. Головянко, А.И. Ильинского, Ф.Д. Руднева и других энтомологов. Этими исследователями были разработаны методы учета насекомых-вредителей (Воронцов А.И., 1982).

Перед началом Великой Отечественной войны в 1941 г., в нашей стране проведение предохранительных природоохранных мероприятий было налажено на значительном уровне. В 1945 г. работы в данной области еще более расширились. Было сформировано в 1947 г. Министерство лесного хозяйства СССР, которое осуществляло контроль над всеми лесами на территории СССР

и являлось надежной государственной структурой, обеспечивающей бдительный и тщательный надзор за состоянием лесных массивов. Одним из известных энтомологов, работающих в тот момент, был В.Н. Старк. Его исследования были посвящены изучению лесных вредителей. Большое значение для развития прикладной энтомологии имели труды А.И. Куренцова. А.И. Куренцов проводил исследования по систематике, экологии насекомых-вредителей Дальнего Востока, также изучал их ареалы распространения, пытался установить тенденции и закономерности в распространении вредителей на различных территориях. Большая работа проводилась П.А. Положенцевым, который был одним из первых ученых, начавших развивать экспериментальное направление в данной проблематике. До этого исследования в большинстве своем носили описательный характер. П.А. Положенцев изучал майского хруща и стволовых вредителей сосны, что было крайне актуально для лесозаготовительных регионов страны. Он опубликовал большое количество статей, посвященных энтомологии, зоологии и экологии. Сибирский институт физиологии и биохимии растений (г. Иркутск) также не остался в стороне от такого активного изучения тематики, связанной с насекомыми-вредителями. Там были проведены исследования, посвященные изучению анатомии, гистологическим и биохимическим преобразованиям у растений, поврежденных насекомыми, также выяснялась степень антропогенного воздействия и учет, как фактора влияния, на вредителей и растения. Крупным центром в области изучения прикладной энтомологии считался Институт леса и древесины Сибирского отделения АН СССР. Здесь велись широкие биогеоэкологические исследования фауны, изучались филлофаги, динамика численности насекомых-вредителей. Также в Институте леса шли крупные исследования по экологии и систематике хищников ксилофагов, энтомопатогенной микрофлоры (Воронцов А.И., 1982; Тамарина Н.А., 1990; Вязников А.Н., Соколов Г.И., 2006).

За рубежом прикладная энтомология также занимала значимое место. Она возникла ещё в начале XIX в. в Германии и была связана с именем

энтомолога И. Ратцебурга (1837-1872 гг.). Мировой известностью пользовался многотомный труд (1923-1942 гг.) проф. К. Эшериха, ставший настольным у лесных энтомологов Европы. Ф. Швердтфегер изучал динамику численности и экологию насекомых, также написал книгу «Die Waldkrankheiten» Большой интерес представляли многочисленные работы по прикладной энтомологии, выполненные в Польше, Болгарии и Югославии. В рамках этих НИР изучались биологические методы борьбы, динамика численности листогрызущих насекомых, вопросы прогнозирования, экологии отдельных видов насекомых. Также известны работы лесных энтомологов Финляндии У. Сааласа и Э. Кангаса. Интересна кооперация учёных Скандинавских стран. Они совместно решали проблему борьбы с большим сосновым слоником. Исследования в области прикладной энтомологии в Канаде и вся организация службы лесозащиты привлекали большое внимание энтомологов нашей страны. Р. Моррисом были разработаны новые подходы к изучению динамики численности лесных насекомых. Исследования были посвящены хозяйственно важным объектам, особенно еловой почковой листовёртке *Choristoneura fumiferana*. Известны работы лесных энтомологов США, такие как изучение короедов, устойчивости к ним древесных пород, по аттрактантам, биологическому методу борьбы с вредителями, динамике численности НШ (Воронцов А.И., 1982).

К концу XX века исследования по защите растений стали проводиться практически во всех научных центрах нашей страны. Были получены значительные успехи. Исследования носили прикладной характер и были направлены на разработку технологии для эффективных мер сдерживания и борьбы с главными вредителями и болезнями лесных насаждений и сельскохозяйственных угодий.

1.2. Глобальные проблемы, связанные с насекомыми-вредителями

Лесной комплекс имеет большое значение, как для жизнедеятельности человека, так и для природы. Для человека он является источником древесины,

бумаги, лекарственного и технического сырья, а также одним из основных видов топлива. Лес – основная составная часть биосферы. Он оказывает влияние на почву, воду, атмосферу. Важная функция лесного массива – поглощение углекислого газа с выделением кислорода. Лес регулирует водный режим, предупреждает наводнения, эрозию почв и изменение ландшафта. В сельском хозяйстве широко применяются минеральные удобрения и химические пестициды. Лесные насаждения, окружающие сельскохозяйственные угодья, во много раз сокращают попадание этих химических веществ с полей в водные резервуары. Таким образом, лес предотвращает загрязнение внутриматериковых вод опасными для жизни человека и природы химическими веществами (Берриман А., 1990).

Лесной комплекс – это «дом» для флоры и фауны. Он является сложной экосистемой, объединяя животных, растения, грибы, микроорганизмы. Однако, как и любой живой организм, он не защищен от таких факторов, как болезни. Существенный ущерб лесам способны нанести насекомые-вредители. Они повреждают различные части деревьев и кустарников. Это может привести к таким последствиям, как снижение прироста и плодоношения растений, нарушение процесса возобновления и роста, преждевременное отмирание и повреждение древесины (Берриман А., 1990). Без использования инсектицидов мировые потери в сельском и лесном хозяйствах были бы катастрофически велики. Многие виды в отрядах жесткокрылых, двукрылых, полужесткокрылых, прямокрылых и трипсов (бахромчатокрылые) наносят значительный ущерб в хозяйственной деятельности людей, однако наиболее опасными фитофагами среди членистоногих считаются личиночные формы чешуекрылых, поэтому около 40 % всех химических инсектицидов направлены против различных видов шелкопрядов, совок и мотыльков.

Применение химических средств защиты леса от насекомых-фитофагов началось во второй половине двадцатого века. Ядохимикаты обладают рядом достоинств: высокая экономическая эффективность, быстрый эффект, удобство хранения и использования (Зинченко В.А., 2012). Однако загрязнение

окружающей среды, накопление остатков в частях древесных растений, стойкость и возможность циркуляции в биосфере, сравнительно быстрое возникновение у вредителей резистентности к пестицидам осложняют использование химического метода борьбы с насекомыми-вредителями. Но, несмотря на эти аспекты, консалтинговая компания SBI оценивает объем продаж химических пестицидов в мире более чем на 52 млрд. долларов. Глобальные экономические кризисы, давление на этот сектор торговли со стороны СМИ и экологов не смогли помешать увеличению выпуска ядохимикатов (Ганиев М.М., Недорезков В.Д., 2006).

В 1940 г. был успешно применен дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). В 60-х годах стали использоваться фосфорорганические карбаматные пестициды. Казалось, что с помощью ядохимикатов можно полностью контролировать численность насекомых-вредителей. Но, несмотря на изначальный оптимизм, уже в течение первых лет отмечались случаи возникновения у малярийного комара *Anopheles messeae* устойчивости к ДДТ. По документации ВОЗ резистентностью насекомого считается – развитие способности у отдельной расы одного вида организмов выдерживать дозы ядовитого вещества, которые были бы смертоносными для большинства особей в нормальных (восприимчивых) популяциях данного вида. На данный момент резистентность к инсектицидам зарегистрирована у большинства значимых для человека насекомых-вредителей (Brown A.W.A., 1986).

Подавление естественных регулирующих механизмов биоценоза является одним из важных недостатков использования химических пестицидов широкого спектра. В связи с этим размножение отдельных видов насекомых-вредителей, численность которых раньше не превышала или редко достигала экономически значимого уровня, стало массовым и превысило критические пороги. Ввиду этого были найдены новые пути защиты лесного комплекса, такие как биологические методы контроля численности насекомых-вредителей (Zarins I., Jankevica L., 2010).

1.3. Современные биологические методы контроля численности насекомых-фитофагов

Биологическая борьба с вредителями сельскохозяйственных культур и лесных массивов особенно важна в Сибири и на Дальнем Востоке ввиду того, что климат в этих регионах достаточно суровый. Биологический метод борьбы с насекомыми-фитофагами заключается во введении их естественных врагов, таких как вирусы, бактерии, простейшие, грибы и энтомофаги в популяцию вредителя для его подавления (Вейзер Я., Бриггс Д.Д., 1976). Биологические методы защиты растений позволяют регулировать и корректировать численность одного вида или группы видов вредителей, сохраняя природные комплексы полезных организмов. Внесение микробиологических препаратов в агроценоз не противоречит естественным процессам. Не менее важно и то, что действующее начало биопрепаратов в большинстве случаев не проникает в ткани растений и не оказывает вредного действия на человека (Гулий В.В. и др., 1981). Каждый вредитель восприимчив только к определенному микроорганизму, что обуславливает трудоемкость создания биологических препаратов, которое начинается с поиска и подбора перспективного агента, изучения его влияния на организм насекомого-хозяина. При использовании энтомофагов помимо прочего нужно учитывать климатические условия района, где планируется проводиться биозащита ввиду того, что это может быть значимым ограничивающим фактором.

Существующий уровень внедрения биологических методов защиты растений еще не достиг своего оптимума. Часто на пути этого процесса встают такие трудности: специалисты по охране сельскохозяйственных участков и насаждений, привыкшие к немедленной гибели насекомых-вредителей от ядохимикатов, ожидают равнозначного эффекта от биопрепаратов. Но для развития инфекционного процесса необходимо от 2 до 7 сут. Кроме того, использование биопрепаратов требует более строго соблюдения всех инструкций по использованию и хранению, а также условий применения (Штерншис М.В. и др., 2000; Штерншис М.В. и др., 2011).

1.3.1 Насекомые-энтомофаги

Попытки использовать насекомых-хищников в борьбе с вредителями известны давно. Первые шаги в этом направлении были сделаны китайскими агрономами, которые защищали мандариновые деревья с помощью хищного муравья *Oecophylla smaragdina* F. Реомюр в середине XVIII в. предложил использовать жужелиц для защиты плодовых садов. В конце XIX в. в Калифорнию была завезена кокцинелла *Rodolia cordinalis* Muls. для контроля численности австралийского червеца *Icerya purchasi* Mask. Энтомофаги – это хищники, паразиты и другие организмы, опасные для насекомых, влияющие на естественное регулирование их численности. Среди энтомофагов наиболее известны многочисленные перепончатокрылые – наездники (трихограммы, афелинус, псевдафикус), используемые в борьбе с тлями, червецами и другими насекомыми-вредителями, а также некоторые муравьи, поедающие листогрызущих гусениц; жесткокрылые – божьи коровки, например, родолия, питающаяся австралийским чернецом, жуки стафилины, поедающие вредителей овощных культур, некоторые жужелицы, негативно влияющие на гусениц; двукрылые – мухи-тахины, регулирующие численность не только насекомых, опасных для народного хозяйства, но и других неблагоприятных беспозвоночных (Максимова Ю.В., 2014).

В настоящее время существуют такие методы использования энтомофагов: интродукция, акклиматизация энтомофагов и сезонная колонизация. Интродукция и акклиматизация энтомофагов получили широкое распространение после удачного опыта использования родолии. Так, в США с европейского континента было интродуцировано 15 видов энтомофагов НШ и златогузки. В последующие годы этим энтомофагам удалось значительно снизить численность насекомых-вредителей. Наиболее эффективно интродукция энтомофагов происходит, как было установлено, на территориях с мягким климатом, в субтропиках. На островах Фиджи кокосовая щитовка была уничтожена посредством акклиматизации кокцинеллы *Cryptognatha nodiceps* March. В Колумбию из Великобритании был интродуцирован хальцид *Blastotrix*

sericea Daem., благодаря чему удалось контролировать численность орешниковой ложнощитовки. Подавить численность инжирной запятовидной щитовки стало возможным после завоза из Италии афелинид. В Канаде в начале XX в. боролись с большим листовенничным пилильщиком *Pristiphora erichsoni* Hart. посредством интродукции наездника ихневмонид *Mesoleius tenthredinis* Morley. В 1955-1960 гг. в Канаде потери от повреждений дубовых насаждений таким фитофагом, как зимняя пяденица оценивали в более чем 2 млн. долларов в год. Для защиты растений от этого вредителя были завезены тахина *Cyzenis albicans* Fall и ихневмонид *Agrypon flaveolatum* Grav, которые полностью ликвидировали вредителя в дубовых насаждениях. В ореховых лесах Киргизии для борьбы с яблонной молью был завезен наездник агениаспис *Ageniaspis fuscicollis* Dalm. В Узбекистане для борьбы с червцом Комстока был интродуцирован наездник псевдафигус *Pseudaphycus malinus* Gah.

Метод сезонной колонизации сводился к разовому выпуску энтомофагов на территорию, где фиксировалась вспышка увеличения численности определенного вредителя. Запас энтомофага формировался посредством культивирования в лаборатории. В СССР использовались в основном трихограмма и тленомус. Трихограмму выращивали на зерновой моли и заносили в очаги соснового шелкопряда. В странах СНГ культивирование энтомофагов реализуется на различных биофабриках и до сегодняшнего момента является актуальным для биологической защиты растений. В США на ограниченных территориях дубовых насаждений проводились испытания по использованию в борьбе с НШ браконид *Apanteles melanascelus* Rat.

Энтомофаги могут подвергаться воздействию неблагоприятных факторов, к которым относятся обработка растений и почвы ядохимикатами, глубокая вспашка или перекопка почвы, недостаток нектароносных растений. Если устранить эти факторы, то можно использовать для защиты сельскохозяйственных культур и лесных массивов экологических энтомофагов.

1.3.2 Энтомопатогенные нематоды

Нематоды – многоклеточные животные, относящиеся к типу круглых червей, вызывающие гельминтоз у насекомых. Как агенты биологического регулирования количества вредителей леса интерес представляют семейства *Steinernematidae*, *Mermithidae* и *Allantonematidae*. Биологические взаимоотношения нематод с насекомыми различны. Есть нематоды – подлинны патогены насекомых, другие, обитая в кишечнике хозяина, не причиняют ему вреда, или используют насекомых как средство передвижения или укрытия. По взаимоотношениям с насекомыми и по систематическому положению различают три группы круглых червей:

1. Полупаразиты. Обитают в кишечнике хозяина, после его смерти проникают в полость тела, где размножаются и дают ряд поколений.
2. Паразиты. Паразитируют в полости и тканях насекомых, вызывая летальный исход, не размножаются в пораженных насекомых.
3. Комменсалы, сапрофиты. Представители этих групп живут в кишечнике насекомых. С экскрементами яйца нематод покидают кишечник, попадая на корм, тем самым расселяясь внутри популяции насекомого-хозяина. Используют насекомое, как средство распространения (Вайшер Б., Браун Д., 2001; Millar L.C., Barbercheck M.E., 2002).

Использование нематод имеет определенные перспективы (Данилов Л.Г. и др., 2006; Турицин В.С., 2010). В природных условиях заражённость ими лесных насекомых варьирует в диапазоне от 10 % до 20 %. Наиболее полно изучены нематоды, которые поражают короедов, некоторых чешуекрылых (НШ) и восточного майского хруща. Нематоды развиваются в полости тела и различных тканях взрослых насекомых, в личинках или яйцах насекомых, относящихся к различным семействам, имеют размеры в длину от микроскопических до крупных (10-12 см и более). Препараты на основе нематод для борьбы с вредителями леса пока не производятся массово.

1.3.3 Энтомопатогенные грибы

Энтомопатогенные грибы – паразитические грибы, поражающие насекомых. Грибы являются распространенными компонентами лесных биотопов, выступая регулятором в динамике численности вредителей леса.

Споры грибов прилипают к покровам насекомых-вредителей своей маслянистой или слизистой поверхностью. После чего энтомопатогенные грибы проникают в организм насекомого при помощи ферментов, выделяемых ими: хитиназы, протеазы, липазы или путем образования на поверхности кутикулы булавовидных утолщений. Такие утолщения могут быть в форме вздутий на конце ростовых трубок, которые появляются при прорастании грибов. Вегетативное тело гриба, мицелий, попадает в полость тела. Поэтому грибы обладают способностью заражать насекомых, как в фазе личинок, так и в период окукливания и имаго. Грибная инфекция также может проникнуть в тело насекомого и через ротовое отверстие вместе с пищей, через дыхальца или отверстия половых путей.

Грибы, поражающие насекомых, входят в четыре класса: хитридиомицеты (*Chytridiomycetes*), зигомицеты (*Zygomycetes*), аскомицеты (*Ascomycetes*) и несовершенные грибы или дейтеромицеты (*Deuteromycetes*). Несовершенные грибы, например, *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Cordiceps* заражают личинок и имаго. Грибы класса Зигомицетов инфицирует насекомых на стадии личинки с тонкими покровами (пяденицы, совки, листовертки) или гусениц младших возрастов.

По отношению к насекомым-хозяевам грибы выделяют:

1. облигатные патогенные грибы способны развиваться только в живом организме хозяина;
2. факультативные патогены способны к развитию на живых и на мертвых организмах, а также на органическом субстрате;
3. сапрофиты в качестве питательных элементов используют мертвые органические вещества. Являются случайными патогенами для насекомых с ослабленной иммунной системой.

Другой классификацией является спектр патогенности грибов:

1. узкоспециализированные грибы, являются патогенными только для одного хозяина;
2. обладают широким кругом хозяев.

На развитие болезней, которые были вызваны энтомопатогенными грибами, значительно влияют физические факторы. Температура среды, насыщенность воздуха парами воды для разных видов грибов различна. Влажность среды обладает большим значением для развития гриба. Прорастание спор резко может снижаться от солнечной радиации или от сухого воздуха (Евлахова А.А., 1974).

1.3.4 Энтомопатогенные бактерии

Бактериальные инфекции распространены у насекомых, поэтому биопрепараты на основе бактерий широко используются для контроля численности насекомых-вредителей. В биологической защите растений применяются бактерии, относящиеся к порядку *Eubacteriales* класса *Schizomycetes*. В порядок *Eubacteriales* входят 3 семейства – *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* (Вейзер Я., 1972; Штерншис М.В., 2001; Demir I et al., 2012).

К семейству *Pseudomonadaceae* относятся грамотрицательные, палочковидные, неспорообразующие, с полярно расположенным жгутиком бактерии. Псевдомонады имеют способность использовать разнообразные источники для питания. В основном развиваются на органических субстратах, отдельные виды псевдомонад могут расти на минеральных средах. Во время лабораторного культивирования насекомых были зафиксированы случаи выделения бактериальной массы псевдомонад при гибели насекомых. Считается, что псевдомонады сами не могут проникнуть в организм насекомого, но переносятся нематодами и другими паразитами насекомых. В 1975 г. Старковым В.А. была выделена бактерия *P. carnea* из хлопковой совки.

На основе этой бактерии начали производить препарат карнецин для биологической защиты хлопка.

В семейство *Enterobacteriaceae* входит 12 родов. Энтеробактерии могут быть как облигатными, так и факультативными патогенами. Такую болезнь насекомых, как «красный бактериоз» вызывает представитель рода *Serratia* энтеробактерий, как *S. marcescens* Bizio. Эта бактерия образует палочки и кокки, поражает таких опасных вредителей: колорадский жук, майский хрущ. В основном *S. marcescens* Bizio применяют для борьбы с почвообитающими насекомыми-вредителями на сельскохозяйственных угодьях Новой Зеландии и Австралии.

Семейство *Bacillaceae* характеризуется тем, что бактерии входящие в него образуют термоустойчивые споры. Наиболее значимые для биологической защиты растений роды этого семейства это *Clostridium* и *Bacillus*.

Бактерии из рода *Clostridium* представляю собой подвижные палочки, которые образуют споры. Споры могут иметь различную форму от овальной до сферической. Большинство представителей являются строгими анаэробами. Недавно было обнаружено, что клостридии могут образовывать белковые токсины. Исследовательскими группами были выделены из кишечника заболевших гусениц шелкопряда 2 вида бактерий – это *Cl. malacosomae* и *Cl. brevifaciens*, также *Cl. perfringes* характеризуется, как патоген пчелиной огневки.

Представители рода *Bacillus* имеют также палочкообразную форму. Являются аэробами. Грамположительны. В конце вегетативного роста бактерии рода *Bacillus* образуют споры. Эти бактерии делят на 3 группы по форме споры и набуханию спорангия. В первую группу входят бактерии, которые формируют овальную эндоспору. Овальная эндоспора не вызывает набухания спорангия. К этой группе бактерий относится *B. thuringiensis*. Бактерии, относящиеся ко второй группе, продуцируют круглую эндоспору с набуханием спорангия, к примеру, *B. laterosporus*. Третья группа бактерий формирует сферическую эндоспору с набуханием спорангия, *B. sphaericus*. Из рода *Bacillus*

наиболее изучены такие энтомопатогенные бактерии, как *B. popilliae*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* (Bulla L.A. et al., 1975; Schonherr J., Ketter R., 1979; Штерншис М.В. и др., 2000).

1.3.4.1 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis (Bt) впервые была выделена Л. Пастером в конце XIX в. из гусениц тутового шелкопряда. Идентифицирована немецким бактериологом Берлинером. Отличительной особенностью этих бактерий от других видов рода *Bacillus* является то, что они образуют кристаллы. Кристалл по своей природе является белком, который содержит более 17 % азота и не менее 17 аминокислот, но не имеет в своем составе фосфора. Bt встречается повсеместно: в почве, на листьях, в организмах насекомых и на их покровах (Штерншис М.В. и др., 2000). Bt классифицируют по антигенным свойствам, патогенности для насекомых, чувствительности к фагам и биохимическим свойствам. Для биологической защиты растений наиболее значима классификация Bt по патогенности. Патовариант А включает в себя патогенные для отряда чешуекрылых подвиды Bt. В патовариант В входят бактерии патогенные для двукрылых. И в С патогены жесткокрылых. К метаболитам Bt относят различные классы соединений такие как: антибиотики, ферменты, токсины и другие аллелопатики. Среди этих метаболитов наиболее значим δ -эндотоксин. Основные этапы механизма действия эндотоксина состоят из растворения кристалла Bt в кишечнике насекомого-хозяина, дальнейшее взаимодействие токсина с клетками вызывает каскад биохимических реакций. Затем начинается размножение попавших в организм бактерий, сопровождающееся образованием термостабильного экзотоксина и лецитиназы или альфа-экзотоксина (Bulla L.A. et al., 1980). Это фермент вызывает нарушение ионного транспорта через мембрану, разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования и усиление перекисного окисления липидов, вследствие чего увеличивается проницаемость мембран клеток, и формируются литические поры. Это ведет к притоку воды и ионов, набуханию

и лизису клеток. Таким образом, происходит перфорация кишечника и последующая гибель насекомого. Септицемия же является следующим этапом после энтомопатогенного воздействия токсинов. У погибших насекомых разлагается внутреннее содержимое тела, сквозь разрывающиеся покровы отделяется темная жидкость, содержащая в большом количестве кристаллы эндотоксина и споры бацилл (Betz F.S. et al., 2000).

1.3.5 Энтомопатогенные вирусы

Вирусы широко распространены в популяциях насекомых и оказывают большое влияние на динамику их численности (Vago C. et al., 1974). На данный момент известно о более чем 500 вирусных заболеваний насекомых. В 1966 г. комитет по номенклатуре и классификации вирусов (МКТВ) выделил 43 группы вирусов со сходными свойствами, в 7 из которых входили энтомопатогенные вирусы. Значительное количество обнаруженных вирусов насекомых вызвало необходимость в их классификации и систематизации. В основу классификации изначально легла морфология белковых капсид, их локализация в клетке, также вид насекомого, из которого был впервые выделен вирус (Бахвалов С.А., 2001). Классификация вирусов насекомых по Вейзеру Я. (1972) базировалась на наличии и местоположении вирусов в клетках тканей насекомого-хозяина. Все вирусы насекомых были объединены в один тип *Virales*, подтип *Zoophaginae*, семейство *Borrelinaceae* и 4 подсемейства: *Borrelinoidae*, *Paillotelloideae*, *Bergoldioideae* и *Moratorideae*. Каждое подсемейство было разделено на несколько родов. Современная классификация дополнена характеристиками нуклеиновых кислот: число нитей, определенной структурой и полярностью генома (циркулярная, линейная, фрагментарная). На сегодняшний день все основные представители энтомопатогенных вирусов отнесены к 6 семействам: *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Baculoviridae* (Adams J.R., 1991; Бахвалов С.А., 2001).

Семейство *Poxviridae* было сформировано в 1978 г. МКТВ на заседании в Гааге. Это семейство включает в себя подсемейство *Chordopoxvirinae*,

представители которого поражают позвоночных животных, и подсемейство *Entomopoxvirinae* – патогены насекомых. Представители подсемейства *Entomopoxvirinae* были объединены в род *Entomopoxvirus*. Вирусы, входящие в этот род, вызывают заболевания у насекомых таких отрядов: *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*, *Orthoptera*. Одним из представителей данного рода является вирус оспы майского хруща. Вирусные частицы энтомопоксвирусов имеют сложное строение, вирионы овальной формы, достаточно большого размера 420-250 нм. Геном энтомопоксвирусов представляет собой высокомолекулярную ДНК. Во время репликации энтомопоксвирусов в интактных клетках насекомых формируются различные включения. По форме включения могут различаться: овоидные, ромбические и веретеновидные. Размеры включений могут варьировать в диапазоне от 1-5 до 10-12 мкм. Веретеновидные включения могут иметь размер до 25 мкм. Каждое включение содержит в себе несколько десятков вирусных частиц. Репликация вирусов рода *Entomopoxvirus* чаще происходит в жировой ткани насекомого-хозяина. При заражении насекомых в лабораторных условиях первые овальные и веретенообразные включения появляются в перинуклеарной области цитоплазмы отдельных клеток в течение суток. Далее количество включений растет и заполняет большую часть жирового тела. Отдельные исследовательские группы отмечали присутствие вирусных частиц в гемоцитах, мышцах и соединительной ткани (Гулий В.В., Рыбина С.Ю., 1988). Энтомопоксвирусы могут вызывать эпизоотии с высокой смертностью насекомых-вредителей, что делает их перспективными агентами биологической борьбы.

Радужные вирусы (сем. *Iridoviridae*) в основном поражают двукрылых, в меньшей степени чешуекрылых и жесткокрылых. В семействе *Iridoviridae* выделен один род *Iridovirus*. Одним из вирусов, отнесенных к этому роду, является вирус болотной или рисовой долгоножки. Радужные вирусы имеют вирионы в форме икосаэдров диаметром 120-200 нм. Геном иридовирусов представлен однолинейной, двухцепочной молекулой ДНК. Иридовирусы

реплицируются в цитоплазме. Образуют включения в виде кристаллов. Размножение радужных вирусов также происходит в клетках жирового тела хозяина. В острый период течения заболевания на покровах насекомых появляются характерные белые пятна. У личинок *Chironomus plumosus* L., обитающих в Новосибирской области (НСО), в 20 % случаев обнаруживалось поражение иридовirusами. В Северной Америке зарегистрировано еще более значимое поражение личинок этого насекомого до 40 % (Stolz et. al., 1968). Также кровососущие комары из рода *Aedes* подвержены заболеваниям, связанными с вирусами сем. *Iridoviridae* (Дзержинский и др., 1976). Вирусы семейства *Iridoviridae* интересны тем, что вызывают заболевания у всех основных групп животных: от простейших до млекопитающих. Этот факт придает актуальность исследованиям видовой специфичности и экологии радужных вирусов (Гулий В.В., Рыбина С.Ю., 1988).

В семейство *Parvoviridae* включены такие роды: *Densovirus*, *Parvovirus*, *Satellovirus*, *Bullavirus*. Парвовирусы объединяют обширную группу мелких ДНК-содержащих вирусов. ДНК одноцепочечная, вирион не имеет оболочки. В 1964 г. парвовирусы были обнаружены у большой вошинной моли. При этом заболевании в клетках инфицированных гусениц образуются фелльген-положительные образования, состоящие из вирионов. В связи с этим заболевание получило название денсонуклеоз. Вторая отличительная черта этих вирусов заключается в том, что они имеют большую устойчивость к нагреванию, в частности нагревание до 60 °С не снижает вирулентность парвовирусов. При поражении парвовирусами гибель насекомого происходит в первые 4-5 ч после появления первых симптомов. Это происходит из-за прогрессирующего паралича, который вызывают вирусы этого семейства. Заболевание парвовирусной инфекцией было отмечено у таких отрядов насекомых, как чешуекрылые, двукрылые и прямокрылые.

В семейство *Picornaviridae* включены роды *Enterovirus*, *Rinovirus*, *Calicivirus*. Пикорнавирусы характеризуются капсидом в форме икосаэдра, лишенным наружной липопротеидной оболочки. Все пикорнавирусы содержат

линейную одноцепочечную РНК. Изучены вирусы этого семейства: вирус острого и хронического паралича пчел, вирус мешетчатого расплода пчел.

Семейство *Reoviridae* состоит из 5 родов: *Reovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Fitoreovirus*, *Fijivirus*. Группа энтомопатогенных вирусов, вызывающих цитоплазматические полиэдры (ВЦП), не получила официального родового названия. Представители этой группы вирусов имеют ограниченное распространение в природе. Впервые ВЦП был обнаружен у тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. На данный момент в качестве хозяев инсектореовирусов известны насекомые из отрядов чешуекрылых, перепончатокрылых и двукрылых. Вирусные частицы ВЦП имеют гексагональную или округлую форму, диаметр 60-70 нм. Вирион ВЦП состоит из двух параллельно расположенных белковых слоев. РНК вириона имеет форму бимодальной нити. Полиэдры ВЦП имеют форму куба или октаэдра, экосаэдра, ромбододекаэдра. Репликация вируса происходит только в эпителиальных клетках среднего отдела кишечника. В основном полиэдры присутствуют в цитоплазме цилиндрических и бокаловидных клеток. Перед формированием полиэдров в цитоплазме клеток образуется виrogenная строма. Ядро дезинтегрируется, клетки принимают треугольную форму. В конце инфекционного процесса стенки клеток разрушаются, полиэдры попадают в просвет кишечника (Чухрий М.Г., 1982). ВЦП может поражать комаров *Anopheles stephensi*, являющихся переносчиками возбудителя малярии. Комары, инфицированные ВЦП, теряют способность передавать малярийного плазмодия *Plasmodium berghei yoelii*. Это связано с тем, что ВЦП комара *A. stephensi* реплицируется в ооцистах и спорозонтах малярийных паразитов (Knaak N., Fiuza L.M., 2011).

1.3.5.1 Семейство вирусов насекомых *Baculoviridae*

Вирусные болезни, вызываемые бакуловирусами, характерны для насекомых, преимущественно относящихся к отрядам чешуекрылых и перепончатокрылых. Вирусы, относящиеся к семейству *Baculoviridae*, обладают

исключительной специфичностью к своему видовому хозяину, являются безопасными для человека, флоры и фауны. Геном бакуловирусов представлен суперскрученной, ковалентнозамкнутой, двуцепочечной ДНК с размерами от 80 до 180 т.п.н. Геном упакован в вирионы длиной от 200 до 400 нм и диаметром от 40-60 нм. Вирионы, обладающие палочковидной формой, заключены в массивную белковую оболочку, состоящую из белка полиэдрина или гранулина (Гулий В.В., Рыбина С.Ю., 1988; Kuzio J. et al., 1999).

Семейство разделяют на возбудителей полиэдрозов, вирионы которых заключены в белковые тельца-включения типа многогранников, и на возбудителей гранулезов, чьи вирусные частицы локализуются в инклюзиях типа гранул (Pyinykh A.V., 2007).

Первая группа вирусов включает в себя вирусы полиэдрозов. Вирионы палочковидные, ДНК-содержащие, окружены двумя мембранами. Размеры вирусных частиц 260-400×40-80 нм. Вирионы расположены в белковом матриксе одиночно или группами, содержащими 20-27 вирусных частиц. Белковые капсиды имеют форму многогранников, треугольников, трапеций. Полиэдры имеют кристаллическую форму. Полиэдрозы разделяют по типам на кишечный и общий. Для ядерного полиэдроза общего типа характерно развитие вируса в ядрах клеток органов и тканей насекомого. Инкубационный период составляет от 5 до 10 сут. Внешние признаки болезни отчетливо видны у гусениц без густого волосяного покрова и бородавок. Перед гибелью тело насекомого становится молочно-белого цвета. Этому причиной является то, что клетки жировой ткани и гемоциты заполнены полиэдрами, имеющими белую окраску и просвечивающими через истонченные покровы тела. Это наиболее распространенное заболевание среди представителей отряда чешуекрылых. Ядерный полиэдроз кишечного типа от общего типа отличается тем, что вирус реплицируется только в среднем отделе кишечника насекомого, чаще всего поражает фитофагов из отряда перепончатокрылых. Инкубационный период длится от 4 до 15 сут. Во время болезни кишечный сегмент тела гусеницы приобретает белый цвет (Pyinykh A.V. et al., 2004; Ильиных А.В. и др., 2005).

Вторая группа вирусов включает в себе возбудителей гранулезов (ВГ). Одиночные вирионы упакованы в эллипсоидные инклюзии (гранулы). Размеры телец-включений разительно меньше, чем у полиэдрозов. Размер гранул 400×260 нм. Гранулезом заболевают только представители отряда чешуекрылых. Вирус размножается в клетках жирового тела, гиподермы и трахей насекомого. Инкубационный период длится от 6 до 50 сут. Внешние симптомы идентичны симптомам при ядерном полиэдрозе кишечного типа (Гулий В.В. и др., 1981; Eastwell K.C. et al., 1999; Matthews H.J. et al., 2000; Burden J.P. et al., 2002).

Специфичность жизненного цикла бакуловирусов определяется наличием двух форм вирионов. Данные формы различаются по происхождению и по составу капсидов, а также выполняют разные функции. Первая форма, так называемая «occlusion derived virus» (Cabodevilla O. et al., 2011), входит в состав белкового матрикса (полиэдрин или гранулин). Данные вирионы отвечают за первичное инфицирование хозяина, сохранение инклюзий в биоценозе. Вторая форма «the budded virus» – свободные вирионы, высвобождающиеся из инфицированных клеток организма хозяина во время вторичной инфекции (Lewis F.B., Rollinson W.D. 1978; Keating K.A. et al., 1990). Они ответственны за системность инфицирования насекомых. Заражение гусениц вирусом происходит перорально при поедании насекомым растения, на которое попали вирусные частицы. При внедрении вируса в организм насекомого белковый матрикс, заключающий в себе вирусные частицы, под действием щелочной среды и протеазы кишечника разрушается. Высвободившиеся вирионы сливаются своими внешними вирусными оболочками с мембранами микроворсинок клеток цилиндрического эпителия среднего отдела кишечника. По окончании слияния внешней вирусной мембраны с мембраной микроворсинок, вирионы попадают внутрь микроворсинок, а затем в клетки кишечника и других органов. Транскрипция и репликация происходят в ядре клетки хозяина. Сформированные свободные вирионы распространяют

инфекцию по тканям и органам насекомого (Бахвалов С.А., 1995; Глупов В.В., Бахвалов С.А., 1998).

Формирование новых частиц происходит через 3-4 сут. В ядре клетки хозяина накапливаются вирионы. Параллельно осуществляется синтез белка (полиэдрин или гранулин). Результатом реализации этих процессов является образование виrogenной стромы. По окончании созревания вирионы обволакиваются белком, белок кристаллизуется. Осуществляется окончательная сборка телец-включений. Функциональность ДНК клеток насекомого нарушается, в результате чего ядра инфицированных клеток переполняются полиэдрами или гранулами, клетки гибнут, вызывая высвобождение инклюзий и последующую гибель насекомого. При разложении тела мертвой гусеницы инклюзии служат источником инфицирования чувствительных насекомых. К внешним симптомам заболевания относятся: снижение интенсивности питания, замедление движения, изменение окраски и покрова насекомого. В некоторых случаях, особенно при заражении гусениц старших возрастов, у насекомых осуществляются процессы метаморфоза и появляются имаго (Teakle R.E., Burne V.S., 1989). Однако на различных этапах метаморфоза и у взрослых особей наблюдаются различные аномалии. Частым аномальным развитием является незавершенность развития куколки. Встречаются формы, сочетающие в себе признаки и личинки, и куколки. Бабочки могут быть с деформированными крыльями, ассиметричной грудью и брюшком. Самки выходят бесплодными, или не способными откладывать яйца в свойственные им места, что приводит к гибели потомства. Больные самцы не способны к активному полету и поиску самок (Stairs G.R., 1965; Myers J.H. et al., 2000; Бахвалов С.А. и др., 2010).

ВЯП НШ – вирус, входящий в семейство бакуловирусов (*Baculoviridae*). Относится к группе возбудителей полиэдрозов общего типа, вызывающих заболевания у семейства чешуекрылых. Как и любой энтомопатогенный вирус, ВЯП принимает участие в саморегулировании лесной экосистемы. Основным хозяином ВЯП НШ является непарный шелкопряд. Дополнительными

хозяевами могут быть ивовая волнянка *Stilpnotia salicis* L. и златогузка *Euproctis chrysorrhoea* L. Вирионы ВЯП НШ имеют палочковидную форму, размер 360-380×35-40 нм. Вирионы собраны в пучки по 2-10 шт. В среднем один полиэдр содержит 20-40 вирусных пучков, но количество пучком может достигать до 130 шт. Полиэдры имеют неправильную форму и размер от 0,5 до 12 мкм. В среднем размеры полиэдр варьируют в диапазоне от 2 до 5 мкм (Ильиных А.В., Петрова И.Д., 2008). В организме НШ вирус обнаруживается в ядрах клеток жирового тела, гиподерме, эпителии трахеального матрикса, гемоцитах и придаточных железах к мальпигиевым сосудам. ВЯП может находиться в латентной форме, передаваясь от родительского поколения к дочерним организмам (Podgwaite J.D., Mazzone H.M., 1986; Fuxa J.R., Richter A.R., 1993; Ильиных А.В., Ульянова Е.Г., 2005; Бахвалов С.А. и др., 2010). ВЯП НШ способен вызывать эпизоотии в популяциях чувствительных насекомых, которые приводят к длительным депрессиям популяции (Лиховидов В.Е., 1984; Cooper D. et al., 2003). Распространен на различных территориях обитания НШ – Владимирская, Воронежская, Саратовская, Новосибирская, Волгоградская, Свердловская области, Алтай, Урал, Кавказ (Таран И.В. и др., 1979; Пономарев В.И. и др., 2012).

1.3.6 Комбинированные энтомопатогенные агенты

В литературе встречается немало примеров совместного применения биологических препаратов различного происхождения. Особенно это касается контроля численности насекомых – вредителей леса (Young, S.Y., 1990).

Взаимодействие различных биологических агентов довольно часто проявляется в природе при смешанных инфекциях. Наблюдаются такие типы взаимодействий, как независимое сосуществование, антагонизм, синергизм либо аддитивный эффект. Большой практический интерес представляет явление синергизма между вирусами и другими микроорганизмами и может рассматриваться как один из путей повышения эффективности возбудителей

вирусных болезней (Гулий В.В. и др., 1977; Daoust R.A., Gunner H.B., 1979; Burden J.P. et al., 2003).

В литературных данных описываются успешные результаты в данном направлении. Было отмечено усиление действия ВГ американской белой бабочки (АББ) при использовании различных возбудителей в лабораторных условиях (Космачевский А.С. и др., 1972; Сикюра А.И., Красницкая Р.С., 1972). Синергетическое действие ВЯП и грибного препарата боверина проявлялось для гусениц НШ. В полевых испытаниях вирусных препаратов против АББ в Краснодарском крае эффективность борьбы повышалась при добавлении к вирусному препарату энтобактерина. При этом не только повышалась смертность гусениц, но и сокращался срок инкубации вируса.

В исследованиях Тарасевича и соавт. при заражении гусениц озимой совки (ОС) ВЯП и ВГ наблюдался синергизм. В вирионах этих вирусов содержится один тип нуклеиновой кислоты - ДНК. Палочковидные вирионы схожи по размерам, различаются только по морфологии и морфогенезу суперкапсидов. Размеры суперполивирионного капсида (СПВК) ВЯП, внутри которых включены вирионы и полигеномный вирион (ПГВ), составляют 1-7 мкм. Супервирионный капсид (СВК) ВГ в большинстве случаев овально-удлиненной формы, размером 0,3-0,5 мкм. У СВК ВГ обычно насчитывается по одному вириону. В результате анализа гусениц ОС показано, что смешанное инфицирование двумя вирусами увеличивает процент гибели личинок и уменьшает инкубационный период, что указывает на синергический эффект. Изучены ультратонкие срезы тканей гусениц ОС и АББ при моно- и смешанных инфекциях. В идентичных тканях одних и тех же личинок и даже в одних и тех же клетках вирионы ВЯП и ВГ развиваются нормально, обнаружены только аномальные формы суперкапсидов. СВК ВГ ОС, пораженной ВЯП и ВГ, часто имели форму тяжей, внутри которых включалось несколько вирионов. Также выявлялись просто скопления белка, в которых содержались нормальные вирионы (Bergold G.H., 1963; Чухрий М.Г., 1982; Shapiro M. et al., 1984).

У личинок АББ, зараженных ВЯП и ВГ, аномальные формы СВК обнаруживались редко. Частота встречаемости аномальных форм при смешанном инфицировании была такой же, как и при моноинфицировании. ВЯП и ВГ в одних и тех же клетках наблюдали тогда, когда группы инфицированных клеток вступали в контакт (Чухрий М.Г., 1982). В этих случаях ВЯП и ВГ обволакивались клеточными мембранами. Установлено, что гибель гусениц при одновременном инфицировании ВЯП и ВГ увеличивается до 98 % против 90 % и 72 % при моноинфицировании. Кроме того, число сут до достижения ЛВ₅₀ сокращалось на два, а при определенных условиях и до семи сут. Этот факт имеет большое значение для биологической борьбы с насекомыми-вредителями.

В результате изучения вирусных заболеваний гусениц лугового мотылька *Lexostege sticticalis* в период его массового размножения в 1975 г. на юге Украины и Молдавии были обнаружены личинки, погибшие от вирусной инфекции. Выделенный вирус схож как с ВГ, так и с ВЯП. Он развивался в основном в ядрах клеток жировой ткани и гиподермы. Белковые СПВК были очень полиморфны. Среди них встречались следующие формы: кубические, прямоугольные, овально-удлиненные и неопределенные. Размеры суперкапсидов варьировались от 0,5 до 1,5 мкм. На их поверхности не наблюдалось электронно-плотной оболочки, как у некоторых СПВК ВЯП (Чухрий М.Г., 1982; Штерншис М.В. и др., 1994).

Также успешность использования комбинированных агентов была продемонстрирована при защите капусты от капустной совки смесью бактериального и вирусного препаратов в условиях НСО. Установлено также, что резервом повышения микробиологического контроля численности лугового мотылька является аддитивное действие вируса гранулеза и Vt, сокращение при этом латентного периода заболевания и уменьшение доз инфектов.

При изучении действия патогенов на дубовую зеленую листовертку *Tortrix viridada* L. более высокая смертность гусениц достигалась при заражении их нативным ВЯП совместно с микроспоридиями *Nosema tortricis*

W. Однако лучшие результаты были получены при последовательном заражении гусениц III возраста сначала ноземой, а через 7 сут вирусом. При этом значительно сокращался период инкубации вирусной инфекции, и болезнь носила более острый характер (Novotny J., 1988; Bauer L.S. et al., 1998).

Найдены литературные сведения по успешному применению ВЯП и бактериального препарата против кольчатого шелкопряда.

Безусловно, совместное применение энтомопатогенных биопрепаратов, главным образом вирусных и бактериальных, является перспективным направлением в улучшении их эффективности. Преимущество смешанной инфекции выражается в более коротких сроках наступления гибели насекомого и увеличенной инсектицидной активности. Совместное использование бакуловирусов с энтомопатогенными бактериями или грибами сокращает длительный латентный период развития вирусного заболевания (Кизирия Н.Г., 1992). Но, при этом, очевидна необходимость индивидуального подхода к каждому виду насекомого-хозяина. Необходимо изыскание эффективных путей сочетания биологических препаратов различной природы в борьбе с различными вредителями. И наиболее удачные сочетания различных биологических препаратов, подобранные в лабораторных экспериментах, нужно проверять в полевых условиях.

1.4. Обширный полифаг – непарный шелкопряд

Непарный шелкопряд (лат. *Lymantria dispar* L.) является опасным вредителем растений, повреждает деревья лесных (берёза, лиственница, дуб, граб, тополь) и плодовых пород (яблоня, груша, слива, абрикос). НШ отличается ярко выраженным половым диморфизмом. Крылья самки грязно-белые (в размахе до 7,5 см) с несколькими темными зигзагообразными прерывистыми линиями. Брюшко толстое, массивное, покрыто густыми светло-бурыми волосками, усики черные, нитевидные. Самцы гораздо меньше (в размахе крыльев до 4,5 см), с тонким брюшком и перистыми усиками. Крылья буровато-серые, на передних – темные извилистые поперечные полосы.

Размножение двуполое. Превращение полное. За год развивается одно поколение насекомых (Ашимов К.С., 1989).

Весной при достижении среднесуточной температуры $+5-6^{\circ}\text{C}$ начинается отрождение гусениц. После выхода из яиц они несколько суток сидят в «зеркальцах», затем поднимаются в крону. В этот период гусеницы легкие, их тело покрыто густыми щетинками с аэрофорами в основании. Это приспособление способствует переселению вида на значительные расстояния с помощью ветра. Кроме того, гусеницы выпускают паутинки, играющие роль парашютов и также способствующие переносу особей. После расселения начинается питание. Оптимум развития наступает при температуре $+20-25^{\circ}\text{C}$. В этом случае личинка развивается в течение 35–40 сут. В более холодное лето развитие замедляется до 50–80 сут. Температура $+10^{\circ}\text{C}$ является критической – при таком ее значении развитие прекращается. Сумма среднесуточных температур для полноценного развития НШ должна составлять 650–700 $^{\circ}\text{C}$. Молодые гусеницы покрыты очень длинными, превосходящими размеры тела волосками, что способствует переносу их ветром на значительные расстояния. При росте тела длина волосков не меняется. Гусеницы старших возрастов длиной 65–80 мм, серовато-коричневые, волосистые. На каждом спинном сегменте синие и красные бородавки, расположенные парами. Гусеницы мужских особей проходят пять возрастов, личинки самок шесть (Ашимов К.С., 1989).

Куколка матовая, почти черная, в редких ржаво-бурых волосках. Окукливание приходится на июнь — начало июля, происходит на стволах, в трещинах коры, в кроне. Фаза длится 12–20 сут.

Лёт бабочек НШ начинается в июле, иногда немного раньше. Сроки лёта зависят от географического положения и климатических условий текущего вегетационного периода. Вылет самцов происходит на 5–7 сут раньше самок. Наиболее активны особи в вечернее время, но часто лёт данного вида можно наблюдать и днем, особенно при пасмурной погоде. После спаривания самки приступают к яйцекладке. Плодовитость – от 100 до 1200 яиц. Кладки самки

покрывают волосками с брюшка. Яйца отличаются морозостойкостью. Зимуют эмбрионы в виде кладок, внешне схожих с желто-бурыми войлочными подушечками (Баранчиков Ю.Н., Кравцов Б.А., 1981).

НШ обладает значительной экологической пластичностью, что позволяет данному фитофагу расселяться по различным территориям и формировать вспышки массового размножения от фисташников Средней Азии, широколиственных лесов Ирана до таежных лесов Дальнего Востока и березовых колков Сибири. В этих регионах НШ приспособился к различным климатическим условиям и кормовой базе (Баранчиков Ю.Н., Кравцов Б.А., 1981; Макрушина Н.Г., Ашимов К.С., 1984; Бенкевич В.И., 1984; Liebhold A. et al., 2000), что позволяет выделить несколько географических форм вида таких как, к примеру, западносибирская географическая форма, среднеазиатская, восточносибирская и дальневосточная географические формы. В данном исследовании было принято решение остановиться на изучении особенностей западносибирской географической формы НШ.

Ареал обитания западносибирской географической формы находится на территории от Урала до Алтая и Саян. Фенологический срок начала отрождения насекомых совпадает на данной территории со временем раскрытия почек на березе, так как эта порода деревьев является основной кормовой базой для западносибирской географической формы. Самки имаго западносибирской формы хорошо летают, после спаривания и обсыхания каждая самка перемещается на несколько сотен метров для откладывания яиц. Самки размещают яйца на кормовом дереве на достаточно низких высотах для скорейшего укрытия снегом и недоступности для различных паразитических организмов. В итоге основными отличительными особенностями данной географической формы НШ и ее среды обитания являются отсутствие значительных яйцеедов на этой территории, специфичная высота откладки яиц и склонность самок имаго к значительным перемещениям для осуществления яйцекладки (Пономарев В.И., 1992; Колтунов Е.В., 2006; Пономарев В.И. и др., 2012).

1.5. Характеристика Новосибирской области как района обитания непарного шелкопряда

Ареал обитания НШ охватывает несколько областей Российской Федерации – Челябинскую, Свердловскую, Курганскую, Тюменскую, Омскую, Новосибирскую, Кемеровскую, Томскую и Алтайский край. На территориях каждой из областей фиксировались вспышки массового размножения НШ (Пономарев В.И., 2001). В связи с тем, что исследование проводилось на территории НСО, в данной работе приводится характеристика лесорастительных условий только данного региона.

НСО располагается между 75-85° в.д. и 53-57° с.ш., ее протяженность с запада на восток составляет 625 км и с севера на юг 425 км. Общая протяженность границы НСО составляет более 28000 км, а площадь – 178,2 тыс. км². Границы между НСО и соседними областями не имеют отчетливых отличий в природных условиях.

Согласно данным 1980-х годов лесной фонд области составлял 36 % территории. Выделяется пять лесорастительных районов в области относительно их характеру лесной растительности и условий произрастания это – присалаирский, приобский, степной, лесостепной и южнотаежный. Присалаирский лесорастительный район выделяется на юго-востоке НСО, занимает предгорья и низкогорья Салаирского кряжа. В районе преобладают лиственные леса: осиновые и березовые, также в меньшей степени представлены хвойные насаждения. В лесах области основными кормовыми породами деревьев для НШ являются такие березы как: береза повислая и береза белая. Береза повислая более распространена в данном лесорастительном районе, она произрастает на различных почвах, даже на сухих, бедных или засоленных. В лесостепи и степи береза образует березовые колки, смешанные с осинами, также в колках могут фиксироваться и хвойные породы деревьев. Приобский лесорастительный район находится в лесостепной зоне на Приобском плато. На данной территории преобладают сосновые леса. Лесистость района в среднем составляет около 30 %. Почвы варьируют от

темно-серых лесных почв до супесчаных. Рельеф лесорастительного района волнистый. Степной лесорастительный район занимает северную часть Кулундинской степи. Лесной комплекс представлен березово-осиновыми колками, в которых преобладают березы, а осины и ивы составляют только 20 % от общего состава леса. Рельеф района равнинный, климат засушливый, почвенный покров очень разнообразный, но имеет общность в достаточной засоленности. Лесостепной растительный район располагается в центральной части Барабинской низменности. Лес также формируют березово-осиновые колки. Южнотаежный лесорастительный район находится на севере Барабинской низменности. Породы деревьев в этом районе разнообразны и представлены сосной, кедром, елью, пихтой, лиственницей, березой, осиной, тополем. Преобладают, как и на территориях других лесорастительных районов, березы (Таран И.В. и др., 1979; Пономарев В.И. и др., 2012).

Согласно вышеприведенным литературным данным, наиболее распространены в НСО березовые леса, что делает данный регион уязвимым. НШ может в данных условиях проявлять активную жизнедеятельность, нанося вред лесному комплексу НСО.

1.6. Динамика вспышек массового размножения непарного шелкопряда в Новосибирской области

Первая зафиксированная вспышка массового размножения НШ на территории НСО датируется периодом с 1991 г. по 1998 г. В течение этого периода очаги вспышки были отмечены в 16 районах области. В 1995 г. вспышка приобрела наиболее опасные тенденции развития – было поражено более 120000 га. В период с 2001 г. по 2007 г. наблюдалась еще более масштабная вспышка увеличения количества насекомых-вредителей на территории региона, было поражено уже более 20 административных районов области. На территории Западной Сибири НШ поражает такие породы деревьев, как береза, осина, тополь, черемуха, лиственница и многие другие деревья и кустарники (Гниненко Ю.И., 2003). Наблюдения, проводимые за

имаго НШ в 90-х и 2000-х годах, показали, что самки способны к активному перемещению по территории области. В течение вспышки массового размножения самки откладывали яйца не только на кормовые породы деревьев, но и на неспецифичные субстраты, такие как столбы, стены домов, пни, валуны (Знаменский В.С., Лямцев Н.И., 1985; Колтунов Е.В. и др., 1998). Таким образом, расселение НШ происходило и посредством разлета имаго. На территории лесного комплекса Западной Сибири имаго НШ чаще откладывают яйца в небольших березовых колках, в крупных лесных массивах яйцекладки вероятнее всего будут сосредоточены в краевой части леса с южной стороны, где фиксируется большая теплообеспеченность (Воронцов А.И. и др., 1983; Пономарев В.И., 1994; Ильиных А.В. и др., 2011).

Как показывают исследования, в очагах массового размножения НШ обычно не наблюдается повторная дефолиация территории. Это, вероятнее всего, связано с миграцией насекомых и энтоморезистентностью насаждений, которая проявляется в биохимическом изменении состава листьев, что сказывается на кормовом качестве листьев (Ильинский А.И., Тропин И.В., 1965; Баранчиков Ю.Н., 1987; Salminen J.P. et al., 2001). В периоды вспышек массового размножения НШ в степной и лесостепной зонах НСО, было замечено смещение границы очагов на 50-70 км в северо-восточном направлении. По-видимому, смещение границ и плотность поражения насаждений яйцекладками вредителя были обусловлены активным и ветровым перемещением самок имаго, а также их избирательностью относительно местности для откладки яиц (Murray K., Elkington J.S., 1989; Ильиных А.В. и др., 2009; Пономарёв В.И. и др., 2012).

Очаги массового размножения в НСО в большей степени сосредоточены в березовых колках степной и лесостепной климатических зон. Местная популяция НШ отличается миграционной активностью имаго. Яйцекладки способны длительное время находиться на открытых участках и демонстрировать устойчивость к различным факторам среды. Береза в течение всего летнего периода времени дает молодые побеги, служащие кормовой

базой, что благоприятно сказывается на скорости развития насекомых. В итоге создаются условия для формирования вспышек массового размножения и расселения такого опасного фитофага, как НШ (Бенкевич В.И., 1984; Myers J.H., 1988; Колтунов Е.В. и др., 2001).

1.7. Анализ современных подходов к культивированию непарного шелкопряда как основного звена в наработке вирусной биомассы

Для разработки многих биологических препаратов необходимо иметь значительное количество экземпляров различных видов насекомых-вредителей. Собирать их в природных условиях трудоёмко, а при низкой численности насекомых невозможно. Вирусы, как агенты биологической борьбы, способны размножаться исключительно в живых клетках хозяина, что обуславливает специфику их наработки (Fuxa J.R., Richter A.R., 1991). Производство биопрепаратов на основе бакуловирусов возможно при использовании культур клеток либо на лабораторных популяциях насекомых. На данный момент второй способ является наиболее оптимальным, как считают большинство исследовательских групп в данной области. Следовательно, важным звеном в наработке данных биопрепаратов является инсектарий и организация массового разведения насекомых. Перед массовым разведением насекомых их освобождают от энтомофагов и болезней. В дальнейшем лабораторные популяции периодически нужно обновлять, так как при длительном разведении они могут стать непригодными (Шагов Е.М., Новикова А.К., 1985; Бойчук Ю.Д., Злотин А.З., 1999).

Для разведения насекомых и их заражения патогенами необходимы большие специальные помещения с кондиционированным воздухом и соответствующим оборудованием. Нужны садки для спаривания и откладки яиц, баки для выкармливания личинок на искусственных средах, ёмкости для окукливания. Все помещения должны быть снабжены автоматическими устройствами для регулирования температуры, влажности воздуха и освещения (Монастырский А.Л., Горбатовский В.В., 1991; Бойчук Ю.Д., Злотин А.З.,

1999). Общими последовательностями для схемы производства биоинсектицидов являются: выращивание биомассы насекомых – культивирование в них необходимых вирусов – выделение вирусной массы – очистка и приготовление готового продукта (Штерншис М.В. и др., 2011).

Несмотря на существующую схему производства биопрепаратов, могут иметься определенные отхождения от общей последовательности либо дополнительные звенья, обусловленные особенностями жизнедеятельности конкретной популяции насекомых и свойств вирусов. Самым длительным и трудоемким в данном процессе является выращивание необходимых насекомых. Технологическое и аппаратное оснащение, которого зависит от характера питания, продолжительности цикла развития, склонности к каннибализму у определенного вида гусениц. При культивировании насекомых очень важно соблюдать санитарные правила и предотвращать возможную контаминацию посторонней микрофлорой оборудования и корма для личинок, для того чтобы минимизировать возможность заболеваний и ухудшения качества субстрата (Злотин А.З. и др., 1965; Старец В.А., 1981).

Одним из главных условий, необходимым для успешного выращивания насекомых в лабораторных условиях, является правильный подбор ИПС. Насекомые растут и развиваются с различной скоростью на разных ИПС, и если ИПС подобрана корректно, то это может снизить объем трудозатрат, ввиду уменьшения сроков выращивания перед заражением гусениц. ИПС могут состоять из 10-12 компонентов. В состав таких сред обычно входят высушенные растения, которыми насекомые питаются в естественных условиях. ИПС должны содержать белки, жиры, углеводы, витамины и минеральные соли. Для обогащения среды протеинами пользуются альбумином или казеином и углеводами (сахарозой, глюкозой, декстрозой). В качестве источника жиров вносят растительные масла либо холестерин. Часто витаминную составляющую заменяют или дополняют хлебопекарными или пивными дрожжами. Уплотнителями, придающими ИПС необходимую структуру, служат агар-агар, целлюлоза или древесная пульпа (Ильиных А.В.,

1996). За рубежом имеются ИПС для многих лесных насекомых. В питательной среде для смолёвки базовым компонентом является размолотая сосновая кора. Для НШ растительную основу может формировать порошок из листьев дуба. На такой среде культивируют НШ в США. Развитие одной генерации проходит за 51 сут, а выход имаго составляет 96,8 % (Яхонтов В.В., 1969).

Производство энтомопатогенных вирусных биопрепаратов нуждается в постоянном контроле активности вируса, отборе, очистке и поддержании высокой вирулентности штаммов вирусов. Периодически проводят контроль соответствия полученного вируса исходному производственному штамму, для предупреждения контаминации используемого штамма активированной латентной инфекцией. Отбор штаммов производится, учитывая два критерия: активность и продуктивность при заражении гусениц стандартной дозой вируса (Ильиных А.В., Чуйкова Г.В., 1989; Evans H., Shapiro M., 1997).

Выделяют вирусную массу из погибших гусениц двумя путями: 1. лиофилизация трупов погибших гусениц, далее измельчение полученного материала и его стандартизация; 2. осаждают вирусный материал из гомогената погибших гусениц путем центрифугирования, после из осажденной массы готовят жидкие либо сухие препаративные формы. После получения готового препарата производится контроль качества готовой продукции с помощью биотестов на насекомых.

Зарубежные коллеги (США) также для производства вирусных биопрепаратов (Gurchek) используют маточные культуры насекомых, которых круглогодично выращивают в промышленных инсектариях. Яйца насекомых распределяют по 170 г в резервуары. Отродившихся личинок выращивают 14 дней при температуре 26 °С. Когда гусеницы достигают IV возраста, их перорально заражают и дальше культивируют при температуре 29 °С. Через 2 недели большинство гусениц погибают. После этого их собирают в пластиковые бутылки и замораживают при температуре -30 °С. Далее замороженную массу оттаивают в течение суток при 4 °С, а затем добавляют дистиллированную воду и смешивают. Получившийся концентрат пропускают

через несколько сит с ячейками различного диаметра, а далее через несколько слоев марли, чтобы удалить крупные частицы и добиться более однородной консистенции. Конечный продукт перед упаковкой и распределением, также как и в нашей стране, подвергается тестированию и определяется соответствие биопрепарата стандартам (Бахвалов С.А. и др., 2005).

На данный момент за рубежом ведутся активные исследования для создания более эффективных штаммов вирусов и клеточной культуры насекомых, так называемое «производство в пробирке» (Yamao M. et al., 1999). Что должно, по - мнению западных коллег, стать альтернативой технологии культивирования маточных линий насекомых и явиться более экономичным и передовым методом получения инсектицидных биопрепаратов.

1.7.1 Факторы среды

Значимым аспектом лабораторного культивирования насекомых является создание экологического оптимума – определенного сочетания условий, характерного для данного вида. При создании таких благоприятных условий в замкнутой биотехнической системе происходит достаточная стабилизация популяции насекомых. К факторам среды (Лямцев Н.И. и др., 2000), которые оказывают воздействие на культивируемую популяцию насекомых, относятся:

Температура и влажность воздуха

Температура тела насекомого зависима от температуры окружающей среды. Температура определяет поведенческие реакции, размеры тела, плодовитость, продолжительность жизни, темпы онтогенеза и интенсивность обмена веществ. Способность переживать воздействие пониженных температур, имеет большое значение в жизни насекомых. Холодостойкость определяет северные границы ареалов многих видов. Устойчивость к температурному воздействию не является величиной постоянной и сильно изменяется в зависимости от физиологического состояния и биохимических особенностей организма насекомого. Температура, при которой начинается развитие насекомого, называется нижним порогом развития, а при которой

заканчивается активная жизнедеятельность – верхним порогом. Нижний порог развития у разных насекомых колеблется в пределах $+5-(+10\text{ }^{\circ}\text{C})$. Верхний порог зависит от вида, фазы развития насекомого, но не превышает $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$, чаще всего находится в пределах $25-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Эффективные температуры – это температуры, выходящие за пределы нижнего порога и не превышающие верхнего. Каждое насекомое для своего развития требует определенной суммы эффективных температур. Температурой определяется как сама возможность жизни насекомого, так и интенсивность ее проявления, благодаря изменению уровня обмена веществ. Действие температуры неотделимо от влажности воздуха (Яхонтов В.В., 1969).

В теле насекомых содержится большое количество воды около 70-90 % относительно веса тела. Вода является значимым участником обмена веществ. Она необходима в качестве растворителя для пищеварения, циркуляции питательных веществ, выноса экскретов, регуляции осмотического давления. В теле насекомых вода находится в свободном состоянии или адсорбирована различными веществами, при окислении которых вода освобождается и поступает в общий обмен веществ. Обладая малыми размерами тела, а, следовательно, и большей поверхностью испарения, насекомые оказываются очень зависимыми от влажности среды. Насекомые испаряют очень много воды через покровы тела, трахейную систему, при линьке, работе различных секреторных органов. Пополнение запасов воды происходит при вдыхании ее с водяными парами воздуха и поглощения ее в составе пищевых масс. Поддержание в организме в нужных пределах влаги регулируется различными приспособительными механизмами. Такими механизмами, регулирующими водный обмен у насекомых, являются морфологические, физиологические и экологические адаптации.

По степени требовательности к влажности среды, насекомые делятся на: влаголюбивых – гигрофилов (стрекозы, комары), умеренно влаголюбивых – мезофилов (ОС) и сухолюбивых – ксерофилов (саранча). Избыток влажности воздуха обычно не приводит к гибели, но сказывается на длительности

развития. Недостаток влажности переносится хуже, наблюдается депрессия, снижается плодовитость, и часто это вызывает гибель насекомых. Самцы лугового мотылька при высокой температуре и низкой относительной влажности воздуха становятся стерильными, а у самок происходит рассасывание зачатков яиц в яйцевых трубочках. Осадки и влажность влияют на темпы смертности, плодовитость, сроки развития насекомых, их подвижность и географическое распространение (Яхонтов В.В., 1969).

Освещение

Свет оказывает прямое влияние на насекомых. Солнечная радиация ускоряет развитие насекомых особенно в северных широтах. В этих районах сумма эффективных температур за вегетационный период оказывается ниже тепловой константы, необходимой для многих видов насекомых. Тем не менее, на севере при прочих благоприятных условиях большинство насекомых завершают весь цикл развития. В этих широтах недостаток атмосферного тепла компенсируется прямой солнечной радиацией. Насекомые сильно отличаются по разным диапазонам восприятия света. Ночные и почвенные насекомые требуют узко ограниченных световых условий, а виды с круглосуточной активностью имеют широкий диапазон реагирования на освещенность. Освещенность в значительной мере определяет ряд важнейших жизненных процессов: оплодотворение, яйцекладку, выход имаго. Длинный световой день способствует беспрепятственному развитию многих видов, тогда как более короткий период освещенности, наступающий в конце лета – начале осени, стимулирует переход в состояние диапаузы. Короткий световой день является сигналом скорого наступления неблагоприятного осенне-зимнего периода жизни, и переход в состояние диапаузы, поэтому обеспечивает виду своевременную физиологическую перестройку к зимовке (Верещагина В.В., 1952; Яхонтов В.В., 1969; Лямцев Н.И., Дмитриева И.В., 1998).

В условиях неприродного (промышленного или лабораторного) разведения световой фактор действует сильнее, чем в природе. Это связано с тем, что в искусственных условиях могут быть ограничены приспособительные

реакции насекомых. Свет косвенно может проявлять частичное подавление патогенных микроорганизмов. В лабораторных и производственных условиях длина светового дня может регулироваться, однако изменение спектрального состава света и интенсивности освещения в течение суток вызывают значительные трудности. А это может быть включено в специфические потребности вида. Часто данный фактор диспропорционален относительно возрастным потребностям вида и изменениям суточных температур. Это может приводить к нарушению диапаузы, а также дестабилизации жизнеспособности и продуктивности популяции.

Аэрация

Большое влияние ветра на насекомых связано с тем, что от него в значительной степени зависит испаряющая сила воздуха и, следовательно, это тесно связано с водным обменом у насекомых. Также благодаря ветру происходит миграция насекомых в природе. Известны случаи переноса хлопковой моли на высоте около 1 км из Мексики в США. Фиксировались случаи заноса тлей с Кольского полуострова на снежные массивы Шпицбергена (Яхонтов В.В., 1969). Ветер способствует расселению и личинок, обладающих парусностью. Например, гусеницы НШ имеют волоски вдвое длиннее самого тела, что обеспечивает их перенос с восходящими потоками воздуха (Elkinton J.S., Liebhold A.M., 1990; Марков В.А., 1999). Существует мнение, что формирование и перемещение очагов НШ связано с меняющимся направлением ветра и встречными естественными преградами.

При искусственном разведении насекомых отсутствует существенное значение влияния ветра, однако искусственная аэрация может улучшать газообмен (выводя углекислый и другие газы), что будет ускорять испарение ненужной влаги, тем самым улучшая санитарные условия содержания насекомых. Но в то же время излишнее вентилирование может пагубно влиять на яйца некоторых видов насекомых, приводя к их высушиванию и гибели. Также отрицательным может быть высушивание пищевого субстрата, что

ухудшит его качество и отрицательно скажется на жизнеспособности популяции.

Взаимодействие с другими организмами

Насекомые – неотъемлемая часть природного мира и связаны многими межвидовыми взаимоотношениями. Хищники, паразиты, микроорганизмы существенно влияют на численность популяции. Это влияние разнообразно и связано с биоценозной плотностью популяций. Но при правильном искусственном разведении роль этого влияния на численность лабораторной популяции насекомых уменьшается. Однако роль патогенной микрофлоры возрастает при культивировании, и чем больше плотность, тем больше влияние. Это связано с тем, что большая плотность популяции приводит к увеличению частоты контактов между насекомыми, что повышает возможность передачи инфекции (Vilaplana L. et al., 2010), а снижение жизнеспособности провоцирует возникновение массовых болезней и активации латентных инфекций (Сироткин В.Н., 1981; Yahner R.H., Smith H.R., 1991; Volkman L.E., 1997).

Жизнеспособность и продуктивность особей, их физиологическое состояние, внутрипопуляционные и биоценотические взаимоотношения во многом определяются плотностью популяции. При искусственном разведении исключаются многие природные условия влияния на плотность популяции. Но соответствующие поведенческие особенности, связанные с этими явлениями, остаются. Поэтому лабораторная популяция насекомых при разведении становится чувствительна к повышению плотности (Викторов Г.А., 1965; Знаменский В.С., Лямцев Н.И., 1980; Саулич А.Х., 1999).

Питание

Кормовой фактор оказывает прямое и косвенное воздействие на плодовитость, быстроту развития, подвижность, диапаузу, численность насекомых, их распространение и т.д. (Вшивкова Т.А., 1978; Бахвалов С.А., Бахвалова В.Н., 2009) Доказано, что при питании наиболее предпочтительным субстратом насекомые имеют меньшую смертность, развиваются быстрее, достигают большего веса, оказываются более плодовитыми, холодостойкими,

обладают большей продолжительностью жизни (Баранчиков Ю.Н., 1987). Недостаток пищи задерживает развитие насекомых. Блоха *Pulex serraticeps* при недостатке питания развивается на 10 сут дольше, чем при достаточном объеме корма. Питание личинок насекомых в отдельных фазах может повлиять на пол будущей взрослой фазы. Появление самок у пчел и других общественных насекомых (муравьи, термиты) также связано с пищей.

По характеру питания насекомые делятся на экологические группы. Насекомые, питающиеся только растительной пищей, называются фитофаги. Насекомые, питающиеся за счет животных, являются зоофагами, делятся на паразитов и хищников. Сапрофаги питаются разлагающимися растительными остатками. Некрофаги поедают трупы погибших животных. Кoproфаги питаются навозом. Часто между этими группами нет четкого разграничения. По пищевой специализации различают: монофаги – одноядные (гороховая зерновка, филлоксера); олигофаги – ограниченноядные (колорадский жук, питающийся растениями семейства Пасленовые); полифаги – многоядные (гусеницы ОС, НШ); пантофаги – всеядные (кузнечик, уховертки, тараканы). Чаще всего среди насекомых-вредителей встречаются олигофаги и полифаги (Яхонтов В.В., 1969; Рафес П.М., 1980).

1.7.2 Искусственные питательные среды

Одним из главных условий успешного культивирования насекомых является правильный подбор пищевого субстрата, обеспечивающего физиологические потребности вида (Баранчиков Ю.Н., 1987). Существуют два подхода к решению этой проблемы – использование естественных пищевых субстратов (Злотин А.З. и др., 1965; Старец В.А., Менчер В.М., 1980) – заменителей основного кормового растения (в том числе использование культуры тканей листа) и введение в процесс культивирования ИПС различного состава. Насекомые, как и любые другие живые организмы, имеют определенные потребности в питательных веществах (Зиновьева Л.А., Захарченко И.С., 1974; Цветаева И.А., 1976; Weseloh R.M., Andreadis T.G.,

1996). В ходе различных исследований, проводимых на протяжении длительного периода времени, была разработана схема соотношения питательных компонентов для изготовления сред для культивирования насекомых (табл. 1).

Таблица 1

Компоненты питательных сред для насекомых

Естественный кормовой субстрат	Искусственная питательная среда	
Компоненты	Категория компонента	Вещество
Растительный материал	Обогатители	Белки, аминокислоты
Вода		Липиды
		Углеводы
		Витамины
	Стимуляторы	Фагостимуляторы
		Биостимуляторы
	Добавки	Инертные вещества
		Микробиологические добавки
	Стерилизаторы	Ингибиторы плесени

Как показывает табл. 1, использование естественных кормовых субстратов является более доступным решением, но ИПС имеет более вариативный состав, использование которого позволяет в краткие сроки судить о влиянии определенного компонента на физиологические характеристики насекомых. Что же касается экономической составляющей, то при массовом культивировании некоторых насекомых, в том числе и объекта данного исследования затруднительно использование естественных субстратов в силу их ограниченности (Эдельман Н.М., 1974).

Известна питательная среда для разведения личинок насекомых, в частности гусениц НШ (пат. СССР № 884643), содержащая агар-агар, семена бобовых, порошок из сухих листьев дуба, яблони, тополя, березы и липы, льняное масло, аскорбиновую кислоту, витамины В1, В2, В6, и фолиевую кислоту, сорбиновую кислоту, автолизат пивных дрожжей и воду. В качестве семян бобовых среда содержит проросшие семена маша. Питательная среда имеет следующее количественное содержание компонентов, вес. %: агар-агар (1,13-1,59), семена бобовых (проросшие семена маша – 12,06-15,26), порошок

из сухих листьев дуба (5,28-5,72), яблони (2,26-3,18), тополя (2,26-3,18), березы (0,75-1,91) и липы (0,75-1,91), льняное масло (1,13-1,59), аскорбиновая кислота (0,19-0,48), витамины B1, B2, B6 + фолиевая кислота (0,16-0,19), сорбиновая кислота (0,11-0,16), автолизат пивных дрожжей (13,57-13,99) и вода дистиллированная (остальное до 100%).

Также найдены литературные данные о такой питательной среде для гусениц лесных насекомых-фитофагов (пат. СССР № 1824126), содержащей (масс. %) агар-агар 2,0, соевую муку 3,0, зародыши пшеницы 14,0, кормовые дрожжи 2,4, аскорбиновую кислоту 0,6, бензойную кислоту 0,3, этиловый спирт 1,2, фильтровальную бумагу 0,5, льняное семя 0,4, 0,6%-ный раствор глутамевита 0,3 и воду 75,3 мас.%. По данным авторов патента, ИПС обеспечивает повышение выхода гусениц при разведении НШ за счет увеличения их выживаемости. ИПС содержит повышенное количество белка за счет введения в нее соевой муки, фагостимулятора в виде фильтровальной бумаги; линолевую и линоленовую кислоты, содержащиеся в льняном семени; набор необходимых витаминов и минеральных солей, содержащихся в препарате «Глутамевит» и бензойную кислоту в качестве консерванта.

Для разработки оптимального состава ИПС для культивирования НШ перед нашей исследовательской группой стояли следующие задачи: набор личинками максимальной жировой массы и веса; наиболее быстрое достижение целевого возраста (Ш); легкая подверженность заражению; простой состав; возможность механизации и автоматизации процесса. В научной литературе представлено достаточно составов, которые позволяют культивировать НШ. Однако для рентабельного производства инсектицидного вирусного препарата необходимо решение всех поставленных задач. Наиболее часто встречающиеся в литературе варианты ИПС представлены в табл. 2.

Согласно данным табл. 2 все варианты составов ИПС содержат большое количество дорогостоящих, а в некоторых случаях и токсичных компонентов. Скорость развития гусениц на представленных ИПС низкая. Это делает их ресурсо- и энергозатратными. Ввиду этого, указанные составы ИПС не

позволяют решить поставленные задачи и необходимо предложить альтернативный вариант ИПС.

Таблица 2

Составы ИПС для культивирования непарного шелкопряда

Искусственная питательная среда	Состав среды	Время достижения гусеницами целевого возраста
Среда №1 (пат. СССР № 1209131)	Среда 1.1 – для гусениц I и II возрастов Фасолевая мука Агар Кормовые дрожжи 4 М гидроксид калия Сахароза Фильтровальная бумага 40%-ный йодный раствор формалина Калий двузамещенный фосфорнокислый Аскорбиновая кислота Метабен Вода дистиллированная Среда 1.2 – для гусениц старших возрастов Свекольный жом Дрожжи пивные Солодовые ростки Казеин Премикс для птиц Сахароза Агар Мука фасолевая 40%-ный йодный раствор формалина Калий двузамещенный фосфорнокислый Аскорбиновая кислота Метабен Масло льняное Холин хлорид Фолиевая кислота Вода	30-40 сут
Среда №2 (пат. СССР № 2365213/30-15)	Фасолевая мука Свекольный жом Дрожжи кормовые Солодовые ростки Глюкоза Агар Калий двузамещенный фосфорнокислый 10%-ный раствор формалина	30-40 сут

	Продолжение таблицы 2. Аскорбиновая кислота Метабен Масло льняное Холин хлорид Премикс для птиц Вода	
Среда №3 (пат. СССР № 2950040/30-15)	Агар Набухшие семена бобовых Отруби пшеничные Пивные дрожжи Сахароза Метабен Тетрациклин Формалин Калий двузамещенный фосфорнокислый Водный раствор витаминов B1, B2, B12 и биотина Льняное масло Вода дистиллированная	30-40 сут
Среда №4 (Leonard D.E., Doane C.C., 1966)	Вода дистиллированная Казеин, свободный от витаминов 4 М гидроксид калия Сахароза Фруктоза Зародыши пшеницы Холина хлорид Формальдегид Метилпарагидроксибензоат Агар Аэромицин 55%-ная линолевая кислота Аскорбиновая кислота Витаминный раствор (вода, никотиновая кислота, пантотенат кальция, рибофлавин, тиамин гидрохлорид, пиридоксаль гидрохлорид, фолиевая кислота, биотин, витамин B-12)	30-40 сут
Среда №5 (Ильиных А.В., 1996)	Мука кукурузная Мука соевая Дрожжи кормовые Агар Метабен Аскорбиновая кислота 96%-ный этиловый спирт Вода дистиллированная 50%-ная уксусная кислота Льняное масло	30-40 сут

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

Объект исследования

В работе использовали природные и лабораторные популяции насекомого НШ (*Lymantria dispar* L.), суспензии ВЯП штамм НШ-07 (пат. РФ № 2662960) и штамм НШ-2-85 (пат. РФ № 2117701) из оперативного резерва сектора бакуловирусных исследований, также бактериальную суспензию *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (ООО ПО «Сиббиофарм», г. Бердск).

Реактивы

Питательный агар сухой микробиологический (ГОСТ 17206-96), бензойная кислота (ТУ 6-09-1231-77), вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72), мука соевая (ГОСТ 3898-56), мука кукурузная (ГОСТ 14176-79), дрожжи кормовые (ГОСТ 20083-74), аскорбиновая кислота (фарм. ФС 42-2668-95 «АО РЕАХИМ» Россия), бобы чечевицы (ГОСТ 7066-77), мука ржаная цельносмолотая (ТУ 9293-002-43175543-03), мука гречневая (ТУ 9293-002-43175543-03), 96%-ный этиловый спирт (ГОСТ 5962-2013), 3-% перекись водорода (ГОСТ 177-88), хлорамин Б (ТУ 9392-031-00203306-97), стерильная расплавленная среда МПА (ГОСТ 29112-91), сусло-агар (ГОСТ 29112-91).

2.2 Методы

2.2.1 Приготовление искусственных питательных сред

Наиболее близким аналогом ИПС является среда, разработанная А.В. Ильиных (1996 г.). Эта ИПС послужила средой сравнения. Состав:

Рецептура ИПС № 1 (на 0,5 кг):

Мука соевая	– (20,0±0,1) г
Мука кукурузная	– (60,0±0,1) г
Дрожжи кормовые	– (30,0±0,1) г
Кислота аскорбиновая	– (3,0±0,1) г

10 %-ный раствор бензойной кислоты – $(5,0 \pm 0,1)$ мл

Состав новой среды для личинок НШ был разработан в рамках данного исследования (СОП № 2-029).

Рецептура ИПС № 2 (на 0,5 кг):

Бобы чечевицы – $(40,0 \pm 0,1)$ г

Мука ржаная – $(15,0 \pm 0,1)$ г

Мука гречневая – $(30,0 \pm 0,1)$ г

Дрожжи кормовые – $(15,0 \pm 0,1)$ г

Водный раствор комплекса витаминов
и микроэлементов – $(25 \pm 0,1)$ мл

10 %-ный раствор бензойной кислоты – $(10,0 \pm 0,1)$ мл

ИПС готовили в приведенной ниже последовательности.

В емкости вместимостью 500 мл помещали $(4 \pm 0,1)$ г агар-агара, добавляли к нему (300 ± 1) мл дистиллированной воды и выдерживали на кипящей водяной бане в течение (45 ± 3) мин. Отдельно готовили и смешивали кормовую часть (мучные компоненты) в емкости вместимостью 500 мл согласно вышеприведенной рецептуре. Бобы чечевицы промывали под проточной водой и ополаскивали дистиллированной водой, замачивали бобы за сутки до приготовления ИПС в (150 ± 1) мл дистиллированной воды, перед использованием в составе корма размоченные бобы гомогенизировались. Вода, не впитавшаяся в бобы за сутки, использовалась при гомогенизации.

После охлаждения агар-агара до температуры (53 ± 2) °С обе части смешивали согласно рецептуре. Перемешивание осуществляли гомогенизатором при скорости вращения 4000 об/мин. Далее вносили водный раствор комплекса витаминов и микроэлементов (новая ИПС).

Среду разливали в чашки Петри диаметром 90 мм по (10 ± 2) мл слоем в центр чашки. После этого поверхность корма стерилизовали бактерицидными лампами в течение (40 ± 10) мин.

Среду хранили в холодильнике при температуре (4 ± 1) °С не более 7 сут.

2.2.2 Определение микробного числа в сухих компонентах корма

Стерильную расплавленную среду МПА (для выявления бактерий) и сусло-агар (для выявления дрожжей и плесневых грибов) разливали в стерильные чашки Петри. Навеску (1 г) смеси сухих компонентов корма суспендировали 2 мин в 100 мл стерильной воды. Давали отстояться нерастворимым элементам в течение 5-10 мин. Из надосадочной жидкости отбирали 1 мл и переносили в другую пробирку, заполненную 9 мл стерильной воды. Затем делали посев полученной суспензии на питательные среды и подсчитывали количество выросших колоний (на МПА – через 48 ч инкубирования при 37 °С, на сусло-агаре через 7 сут при 24 °С).

2.2.3 Методика культивирования гусениц непарного шелкопряда

Сбор яйцекладок в очагах массового размножения непарного шелкопряда и их хранение

Для лабораторного культивирования наиболее подходят яйцекладки из очагов массового размножения имаго НШ (рис. 1) с нарастающей численностью. Благоприятным периодом для сбора яйцекладок является промежуток времени с середины сентября до конца октября. На протяжении проведения всего исследования с 2015 по 2019 гг. сбор яйцекладок проводился в период с 20 сентября по 25 октября. Количество яиц в кладке в течение исследования варьировало в диапазоне от 200 до 500 шт, фертильность яиц – 70-90 %, масса 100 яиц фиксировалась в диапазоне 70-95 мг. Отбор яйцекладок осуществлялся на территории НСО.

Хранение яйцекладок осуществлялось в матерчатых мешках в холодильнике при температуре +2 °С. Для обеспечения устойчивого температурного режима холодильник использовали только для хранения яйцекладок. К инкубации яйцекладки были готовы уже в ноябре, но наиболее высокие основные показатели были получены после активации яйцекладок в марте. Готовность яйцекладок к активации проверяли на небольшом количестве яиц, помещенных в чашку Петри. При температуре +26 °С и относительной

влажности воздуха 70 % выход гусениц из яиц происходил в течение периода от 2 до 10 сут с момента начала инкубации.



Рисунок 1. Яйцекладки НШ в очаге массового размножения (НСО, Кыштовский р-н, апрель, 2019 г.)

Групповое культивирование гусениц

В чашки Петри диаметром 90 мм с ИПС рассаживали гусениц и содержали в термостате при 26 °С и относительной влажности воздуха 70 %. Насекомых с помощью стерильного пинцета помещали на внутреннюю поверхность крышки чашки Петри со стерильной фильтровальной бумагой и накрывали чашкой, на которую была нанесена ИПС, таким образом, чтобы среда была сверху. Каждые 4 сут гусениц пересаживали на новые чашки Петри со свежей ИПС. Работу выполняли на стерильном месте. Первый, второй и третий возраст насекомых определяли по набору морфологических признаков (Злотин А.З., 1965), насекомых старших возрастов дифференцировали по ширине головной капсулы (Ильинский А.И., Тропин И.В., 1965). Период развития гусениц до куколок варьировался в диапазоне от 25 до 45 сут (СОП № 2-031; Монастырский А.Л., Горбатовский В.В., 1991).

Возраст гусениц непарного шелкопряда

Возраст гусеницы	I	II	III	IV	V	VI
Ширина головной капсулы, мм	0,6	1,2	2,2	3,2	4,4	6,0

2.2.4 Методика культивирования имаго непарного шелкопряда

Куколок собирали в первые дни после окукливания, разделяя по полу. Помещали в эксикаторы диаметром около 300 мм и накрывали марлей. Куколок содержали при температуре 26 °С и относительной влажности 70 %. Для синхронного вылета имаго самцов содержали в отдельном термостате, где температура фиксировалась на 1-2 °С ниже. Лёт имаго начинался через 10-12 сут после окукливания гусениц НШ. Чтобы создать оптимальные условия отродившимся бабочкам для расправления крыльев, в эксикатор помещают полоски гофрированной бумаги.

После начала вылета имаго самцов и самок ссаживали в один эксикатор, не более чем по 5 пар в каждый. На стенки эксикатора помещали слой марли, в качестве субстрата для откладывания яиц. Разница во времени вылета объединенных в пару насекомых не превышала 2 сут. Имаго содержали в тех же физических условиях, что и куколок при искусственном освещении с фотопериодом 16/8 ч, при температуре 26 °С и относительной влажности воздуха 60-70 %. Затем через 4-5 сут наступала гибель бабочек.

Яйцекладки после спаривания собирали и хранили около месяца при комнатной температуре, далее перемещали в холодильник и хранили до прохождения эмбриональной диапаузы (СОП № 2-032; Ильиных А.В., 1997).

2.2.5 Вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда

Для создания энтомопатогенных препаратов необходимы вирусные штаммы с высокой биологической активностью. Известен штамм ВЯП НШ-2-85 для производства инсектицидного препарата. Штамм ВЯП НШ-2-85

депонирован в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского под номером ГКВ №2156. Штамм НШ-2-85 получен путем перемежающих пассажей на гусеницах НШ различных популяций.

Штамм ВЯП НШ-07 выделен в августе 2015 г. из личинки НШ (гомогената гусеницы) лабораторной популяции, погибшей от активации латентной инфекции с использованием метода слепого пятикратного пассирования образца на личинках НШ путем заражения *per os*, и приготовления гомогената из погибших личинок после каждого пассажа.

Идентификация штамма ВЯП НШ-07 проведена во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Полногеномное секвенирование проведено с помощью технологии MiSEQ (Illumina). Среднее покрытие составило 49.7. Сборка генома проводилась картированием на референс-последовательность с помощью алгоритма BWA (v. 0.7.15).

Характеристика штамма

Размеры полиэдров (мкм): \varnothing 5 – 10, размеры вирионов (нм): 400×80, нуклеокапсидов 310×50 нм. Штамм обладает высокой репродуктивной активностью, хорошо хранится при +4 °С. Оптимальные культуры насекомых для культивирования *Lymantria dispar* L.

Штамм бакуловируса НШ-07 размножали путем инфицирования личинок непарного шелкопряда и дальнейшего содержания их при температуре 26 °С и влажности 70% на ИПС. Выход вируса составил 5×10^8 пэ/гус. при его культивировании на личинках НШ IV возраста.

Чувствителен к эфиру, формалину, хлорамину, хлороформу; нечувствителен к ацетону.

Белковый состав вируса: состоит из 34 полипептидов. Молекулярный вес основных полипептидов: от 18 до 75 МД.

ДНК кольцевая ковалентнозамкнутая. Длина генома 158,9 т.п.н. Доля GC – 57.46%. Установлены сайты рестрикции (кол-во) для HindIII – 20, EcoRI – 20, PstI – 75, BamHI – 14. Ближайшая опубликованная полная последовательность

– KM386655.1 (Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus strain 3029, complete genome) – 1574 замены.

Для человека не патогенен. Высоко патогенен исключительно для личинок НШ и абсолютно безопасен для других видов животных, включая класс Насекомые. Для растений не патогенен.

Антигенные свойства штамма: преципитирующая активность антисыворотки с гомологичным вирусом методом двойной иммунодиффузии составляет 1/32.

Штамм хранится при $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в виде очищенных и лиофильно высушенных при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ полиэдров. Штамм вируса также хранят в погибших гусеницах, помещенных в 50 % водный раствор глицерина при $T=4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Биологическая активность штамма ВЯП НШ-07 составляет $\lg\text{ЛД}_{50} = 2,40 \pm 0,22$ (на гусеницах III возраста НШ лабораторной популяции), $\text{ЛВ}_{50} = 7,5$ сут при заражении дозой ЛД_{90} .

Определение биологической активности ВЯП методом индивидуального заражения гусениц

Готовили серию трехкратных разведений вируса, с физическим титром от 2 ± 10^3 пэ/мл до 2 ± 10^8 пэ/мл. Каждое разведение испытывали в трех независимых экспериментах. Личинок инфицировали методом дозированного заражения по 50 шт на каждое разведение. Биологическую активность вируса оценивали путем определения величин ЛД_{50} и ЛВ_{50} .

Брали стеклянную чашку Петри $d=10$ см без крышки и на её бортик наклеивали герметизирующую плёнку Parafilm M. С помощью одноканальной пипетки переменного объёма Gilson от 0,5-5 мкл наносили исследуемую суспензию на заготовленную наивысшую часть бортика чашки в объёме 0,5 мкл. Помещали на край чашки гусеницу (все манипуляции с насекомыми проводили с помощью кисти). Необходимо было подождать пока гусеница начнёт пить суспензию, далее убедиться в том, что капля полностью выпита, и убрать насекомое в пластиковую чашку Петри $d=5$ см с 0,5 г ИПС (рис. 2). ИПС готовили по СОП № 2-029. Содержали насекомых по СОП № 2-031. При

смене групп насекомых/растворов: заменяли герметизирующую плёнку, кисточку обрабатывали 96%-ным спиртом, меняли носики для пипеток. Присваивали номер группе насекомых и помещали в термостат при температуре 26 °С. Гусеницы гибли от полиэдроза с 7 по 16 сут после инфицирования (СОП № 2-030). Расчеты проводили по методу Кербера.



Рисунок 2. Дозированное заражение ВЯП личинок НШ

Определение наличия полиэдров в погибших гусеницах

Через 4 – 6 сут после инфицирования у гусениц снижается активность передвижения и питания, цвет тела меняется (светлеет или темнеет), ткани разжижаются. Покровы тела разрываются, при этом вытекает бурая жидкость без запаха. Для анализа 1 мкл этой жидкости разводили в 50 мкл дистиллированной воды и исследовали полученную суспензию с помощью световой микроскопии. В случае присутствия полиэдры отчетливо выявлялись при ув. 40×10 (Pyinykh A.V., 2011).

Сбор биомассы погибших гусениц

Гибель гусениц от полиэдроза происходила с 7 по 16 сут после инфицирования. В этот период ежедневно производили сбор погибших насекомых. Из чашек Петри трупы гусениц собирали с помощью вакуумного насоса в емкость из толстостенного стекла. Собранный материал

перекладывали в банку с завинчивающейся крышкой вместимостью 100 мл и хранили при температуре $(7\pm 3)^\circ\text{C}$.

Выделение вируса

Собранную биомассу погибших гусениц помещали в стакан гомогенизатора, добавляли 3-х кратный объем дистиллированной воды и размельчали в течение $(1,2\pm 0,2)$ мин при частоте вращения (133 ± 1) об/с. Гомогенат фильтровали через 2 слоя капроновой ткани с ячейками 0,1 мм. Осадок на фильтре вновь помещали в гомогенизатор, добавляли 3-х кратный объем дистиллированной воды и повторно гомогенизировали в течение $(1,2\pm 0,2)$ мин при частоте вращения (133 ± 1) об/с. Гомогенат фильтровали через 2 слоя капроновой ткани с ячейками 0,1 мм. Вирус из полученных фильтратов осаждали центрифугированием при частоте вращения (100 ± 1) об/с в течение (10 ± 1) мин. Осадок суспендировали в дистиллированной воде до получения густой суспензии. Выделенный вирус хранили при температуре $(4\pm 1)^\circ\text{C}$. Подсчет физического титра полиэдров в вирусной суспензии проводили в камере Горяева.

Подготовка полиэдров ВЯП к электронно-микроскопическим исследованиям

Для электронно-микроскопических исследований образцы полиэдров фиксировали в 4%-ном растворе формалина, затем обработку осуществляли по стандартной методике. Полученные препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JTOL-100S.

Определение выхода полиэдров на 1 зараженную гусеницу непарного шелкопряда

Выход полиэдров на 1 зараженную гусеницу определяли по формуле:

$$B = \frac{T}{N},$$

где:

N – количество гусениц, зараженных дозой ВЯП;

Т – общее количество полиэдров, полученное от погибших гусениц при заражении;

В – выход полиэдров на 1 зараженную гусеницу.

Заражение вирусной и бактериальной суспензиями гусениц непарного шелкопряда

Для заражения гусениц НШ использовались следующие материалы: штамм ВЯП НШ-07 (титр $2,9 \times 10^9$) и споро-кристаллический комплекс *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, (титр – не менее 10^{10} спор/г). Готовили рабочие концентрации методом трехкратных разведений. Бинарный препарат получали посредством смешивания единиц равного объема бактериального компонента и суспензии ВЯП НШ. С помощью одноканальной пипетки переменного объема Gilson от 0,5-5 мкл наносили исследуемую композицию на заготовленную наивысшую часть бортика чашки в объеме 0,5 мкл. Помещали на край чашки гусеницу. Необходимо было подождать пока гусеница начнёт пить суспензию, далее убедиться в том, что капля полностью выпита, и убрать насекомое в пластиковую чашку Петри d = 5 см с 0,5 г ИПС. Рассаживали по чашкам Петри гусениц культивировали при комнатной температуре, ежедневно учитывая количество погибших. Причину гибели насекомых определяли микроскопическим методом. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

*Полевые испытания композиции вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда с *Bacillus thuringiensis**

В ходе полевых испытаний в июне 2017 года в районе с. Шебалино (Республика Алтай) использовали аэрозольную установку ГАРД на базе автомобиля Урал-4320. Была проведена однократная обработка участка леса площадью 20 га смесью вирусного и бактериального агентов. Для сравнения был обработан участок леса площадью 2 га вирусным препаратом на основе ВЯП НШ-07.

Полевые испытания в конце мая 2019 г. проводили в районе поселка Кыштовка (НСО). Была проведена однократная обработка участка с

березовыми колками площадью 1 га комбинацией инфекционных агентов. Для распыления бинарного пилотного биопрепарата использовали опрыскиватель-распылитель Champion PS257. В качестве контроля использовали необработанный препаратами участок леса.

Учёты насекомых и повреждений, ими наносимых, проводили по методике, принятой при проведении регистрационных испытаний (Воронцов А.И. и др., 1983; Долженко В.И. и др., 2004). Защитный эффект определяли по формуле:

$$Z_{\text{эп}} = D_{\text{к}} - D_{\text{о}},$$

где:

$Z_{\text{эп}}$ – защитный эффект, %;

$D_{\text{к}}$ – дефолиация крон на контрольном участке, %;

$D_{\text{о}}$ – то же на опытном участке, %.

2.2.6 Планирование экспериментов

Для постановки всех экспериментов и в частности для разработки альтернативной ИПС для лабораторного культивирования гусениц НШ 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 НШ. 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 ВЯП при заражении.

2.2.7 Статистическая обработка данных

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.

3. 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 DEXPI-57D. Во втором термостате температура та же, влажность низкая ($40\% \pm 6\%$). Фотопериод (день/ночь) составил 16/8 ч. Результаты эксперимента приведены в табл. 4 и рис. 3.

Таблица 4

Динамика роста НШ, %

Сут. от активации яиц	Термостат 1 26 °C ± 1 °C, 70 % ± 6 %				Термостат 2 26 °C ± 1 °C, 40 % ± 6 %			
	Возраст							
	I	III	III	IV	I	II	III	IV
3	100±5*	0	0	0	100±5	0	0	0
5	88±5	12±1	0	0	93±4	7±1	0	0
8	60±4	29±3	11±1	0	75±4	22±2	3±1	0
13	0	37±3	58±4	5±1	20±2	48±3	32±3	0
17	0	0	83±5	17±2	0	30±3	65±5	5±1

* Процент гусениц определенного возраста от общего их количества

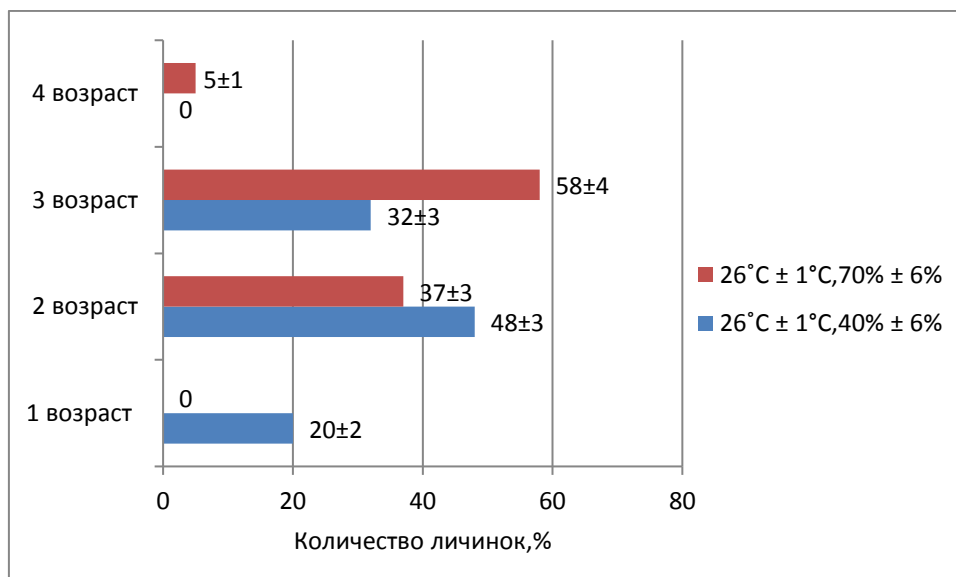


Рисунок 3. Соотношение возрастных групп НШ на 13 день от момента выхода личинок из яиц ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 6\%$; $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40\% \pm 6\%$), %

Таким образом, количество суток, необходимое для массового достижения целевого (III) возраста насекомыми, которых культивировали при температуре $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ и повышенной влажности ($70\% \pm 6\%$) в термостате 1, составило примерно 14 сут (табл. 4). Для насекомых, которых культивировали при той же температуре, но пониженной влажности ($40\% \pm 6\%$), данный показатель превысил 2 недели (рис. 3).

Также выполнена дополнительная серия экспериментов. В первом термостате температура пониженная ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) и повышенная влажность ($70\% \pm 6\%$). Во втором термостате температура та же, влажность низкая ($40\% \pm 6\%$). Результаты эксперимента приведены в табл. 5. При использовании температуры $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ при культивировании НШ к 13 сут показатель особей, достигших целевого возраста, значительно ниже, несмотря даже на использование повышенной влажности в одном из термостатов (рис. 4). 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.

Таблица 5

Динамика роста НШ, %

Сут. от активации яиц	Термостат 1 20 °C ± 1 °C, 70 % ± 6 %				Термостат 2 20 °C ± 1 °C, 40 % ± 6 %			
	Возраст							
	I	III	III	IV	I	II	III	IV
3	100±5	0	0	0	100±5	0	0	0
5	89±5	11±1	0	0	94±5	6±1	0	0
8	72±5	23±2	5±1	0	81±4	17±2	2±1	0
13	46±4	42±3	12±1	0	68±4	25±3	7±1	0
17	16±1	40±3	36±3	8±1	34±2	46±3	18±2	2±1

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

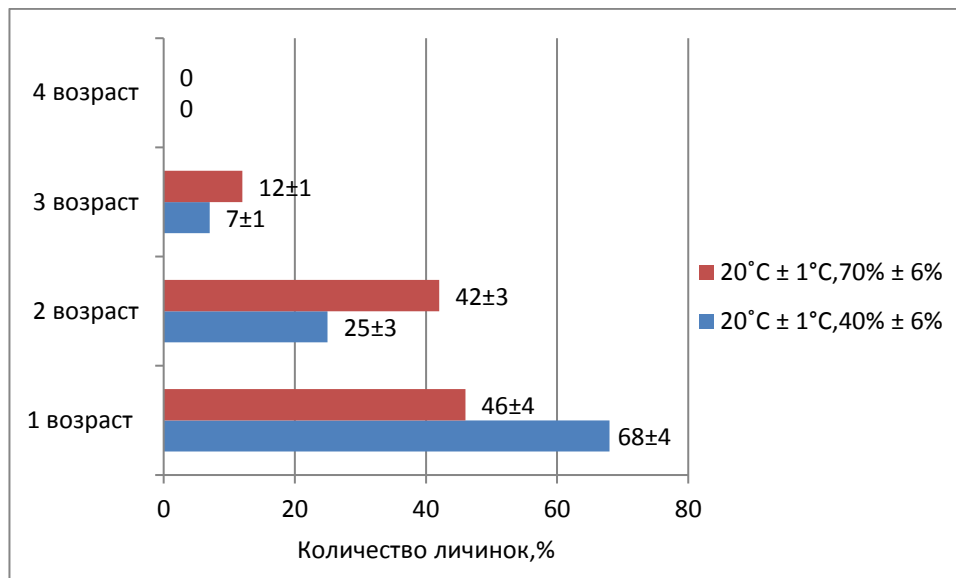


Рисунок 4. Соотношение возрастных групп НШ на 13 день от момента выхода личинок из яиц (20 °C ± 1 °C, 70 % ± 6 %; 20 °C ± 1 °C, 40 % ± 6 %), %

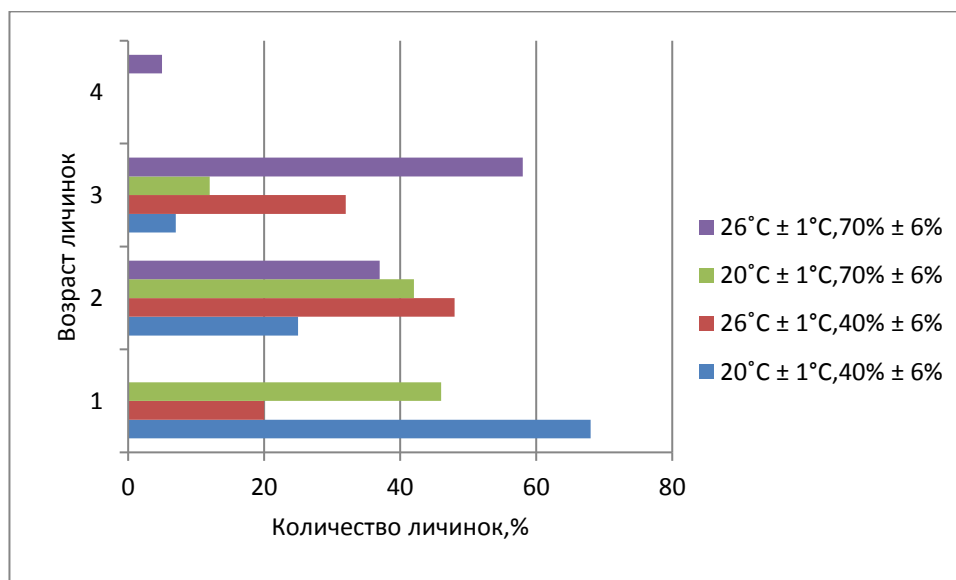


Рисунок 5. Соотношение возрастных групп НШ на 13 день от момента выхода личинок из яиц во всех экспериментах, %

При рассмотрении рис. 5 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 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ и влажности $70\% \pm 6\%$. Самые неблагоприятные показатели по скорости достижения целевого возраста личинками НШ были получены при таких физических показателях: $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ и $40\% \pm 6\%$.

В экспериментах по подбору ИПС для культивирования НШ было апробировано 5 составов ИПС, 4 из которых были разработаны в рамках данного исследования, и 1 состав был известен (Ильиных А.В., 1996). Новые составы ИПС:

Рецептура ИПС № 2 (на 0,5 кг):

Бобы чечевицы	– (40,0±0,1) г
Мука ржаная	– (15,0±0,1) г
Мука гречневая	– (30,0±0,1) г
Дрожжи кормовые	– (15,0±0,1) г
Водный раствор комплекса витаминов и микроэлементов	– (25±0,1) мл
10 %-ный раствор бензойной кислоты	– (10,0±0,1) мл

Рецептура ИПС № 3 (на 0,5 кг):

Бобы гороха	– (40,0±0,1) г
Бобы фасоли	– (15,0±0,1) г
Крупа манная	– (15,0±0,1) г
Мука рисовая	– (30,0±0,1) г
Дрожжи кормовые	– (15,0±0,1) г
Кислота аскорбиновая	– (3,0±0,1) г
10 %-ный раствор бензойной кислоты	– (10,0±0,1) мл

Рецептура ИПС № 4 (на 0,5 кг):

Бобы фасоли	– (40,0±0,1) г
Мука травяная из люцерны	– (30,0±0,1) г

Мука пшеничная	– (15,0±0,1) г
Дрожжи кормовые	– (15,0±0,1) г
Кислота аскорбиновая	– (3,0±0,1) г
10 %-ный раствор бензойной кислоты	– (10,0±0,1) мл

Рецептура ИПС № 5 (на 0,5 кг):

Бобы чечевицы	– (40,0±0,1) г
Мука ржаная	– (15,0±0,1) г
Мука травяная из люцерны	– (30,0±0,1) г
Дрожжи кормовые	– (15,0±0,1) г
Кислота аскорбиновая	– (3,0±0,1) г
10 %-ный раствор бензойной кислоты	– (10,0±0,1) мл

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. 6), скорости достижения целевого возраста и веса насекомых (рис. 7).

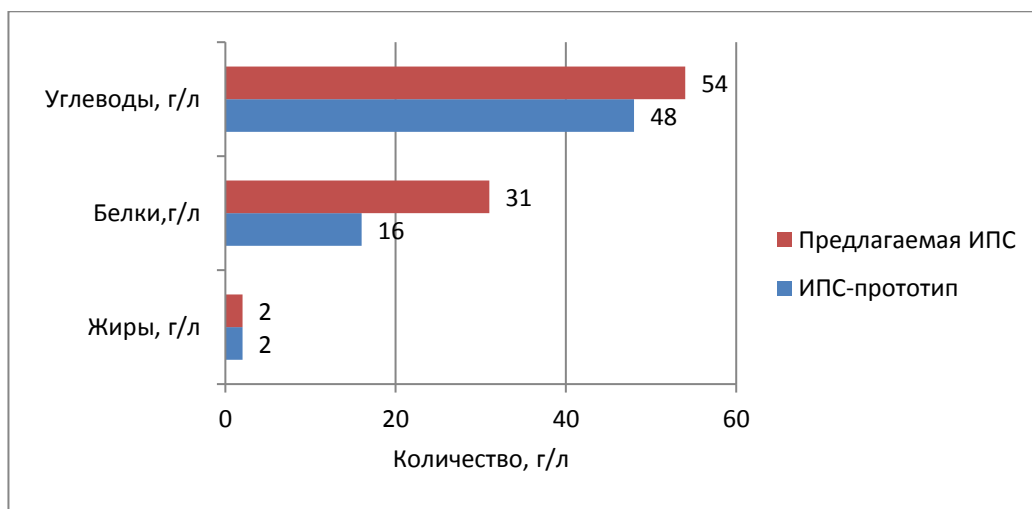


Рисунок 6. Анализ количества макроэлементов в составе среды-прототипа и предлагаемой ИПС, г/л

Предлагаемая ИПС дополнена водным раствором комплекса витаминов и микроэлементов при следующем соотношении компонентов (табл. 6).

Таблица 6

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. 7), а количество макроэлементов и витаминов, получаемых вместе с новым кормом, превышает известный наиболее близкий аналог. Таким образом, применение предлагаемой ИПС позволяет оптимизировать процесс культивирования НШ.

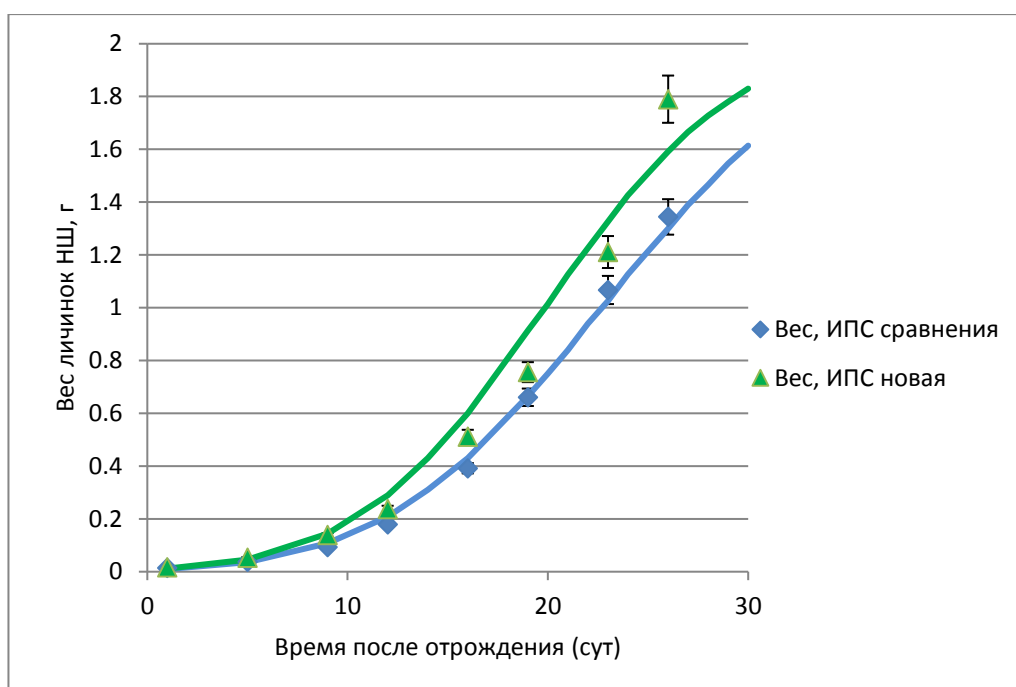


Рисунок 7. Сравнение динамик изменения веса гусениц НШ при питании средой сравнения и предлагаемой ИПС, г

Суммируя экспериментальный материал, можно заключить, что при выращивании насекомых на новой ИПС масса особей значительно возросла. 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. 8).

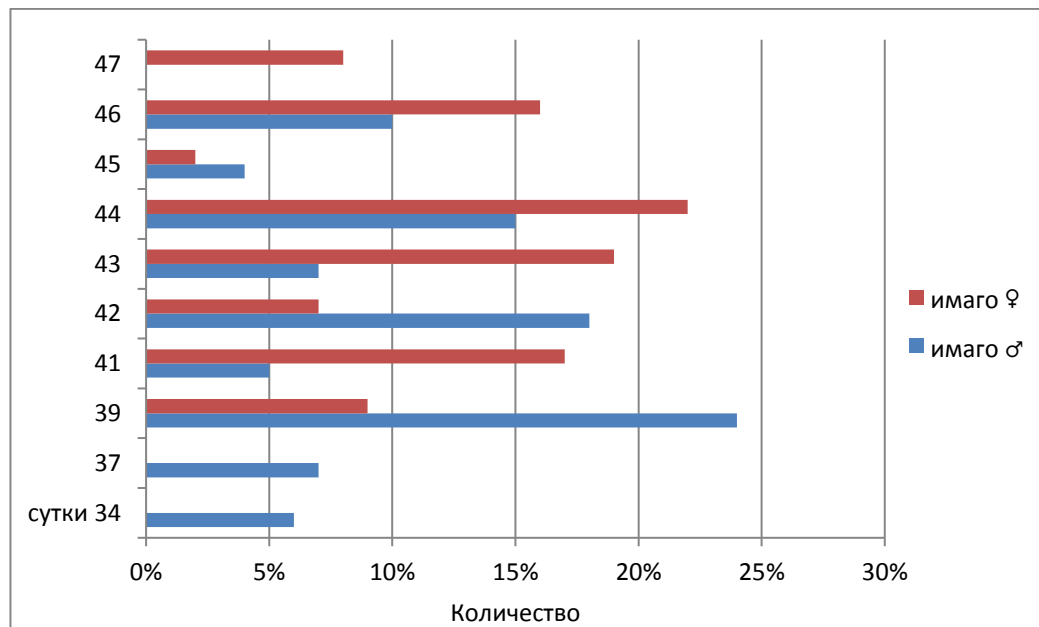


Рисунок 8. Получение имаго НШ, %

Таблица 7

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. 7 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 стандартизации насекомых, передаваемых на наработку вирусной биомассы, был разработан акт передачи гусениц НШ:

Акт передачи гусениц № _____

Вид гусениц	Непарный шелкопряд
Дата передачи гусениц	30.07.2019 г.
Популяция (откуда и когда получена)	Кыштовский р-н, НСО, октябрь 2018 г.
Поколение	1
Возраст гусениц	3
Количество переданных гусениц	500
Дата начала активации	15.07.2019 г.
Дата выхода гусениц из яиц	18.07.2019 г.
Процент гусениц погибших от выхода до момента передачи	5 %
Наличие полиэдров в погибших гусеницах	Да/ <u>Нет</u>
Передал (Ф.И.О., подпись)	Охлопкова О.В.
Получил (Ф.И.О., подпись)	Томилов А.А.

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 пэ/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. 8. 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.

Таблица 8

Данные биологической активности штаммов вирусов ВЯП НШ

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

В табл. 9 представлены данные по выходу вируса при использовании штаммов ВЯП НШ-2-85 и ВЯП НШ-07.

Таблица 9

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. 9), что показывает значительно более

высокую продуктивность нового штамма по отношению к штамму ВЯП НШ-2-85, а значит и большую эффективность.

В представленной НИР предлагается оптимизировать состав биопрепаратов, используемых для защиты лесов от НШ за счет применения композиции бактериального и вирусного агентов. Бактериальный компонент обеспечит быструю гибель части насекомых уже в первые несколько суток после обработки. Вирусный компонент, на основе ВЯП НШ, обеспечит гибель оставшихся насекомых, и в дальнейшем вирусная эпизоотия будет удерживать численность НШ на экономически безопасном уровне. Бакуловирусы способны к горизонтальной и вертикальной передаче, поэтому даже однократная обработка бакуловирусами инициирует эпизоотию полиэдроза в популяции насекомых. Таким образом, компоненты композиции взаимно дополняют друг друга, что позволит увеличить период действия и снизить расход с сохранением высокой эффективности указанных биоинсектицидов (Сикура А.И. и др., 1972).

Для решения поставленной задачи, была выполнена серия лабораторных экспериментов, состоящая из четырех повторов. В ходе исследования учитывали количество погибших насекомых при заражении бактериальной, вирусной суспензиями и их смесями. Динамика гибели гусениц НШ была рассчитана для периода с 1 по 14 сут после заражения.

Проведенные нами исследования показали (рис. 9), 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.

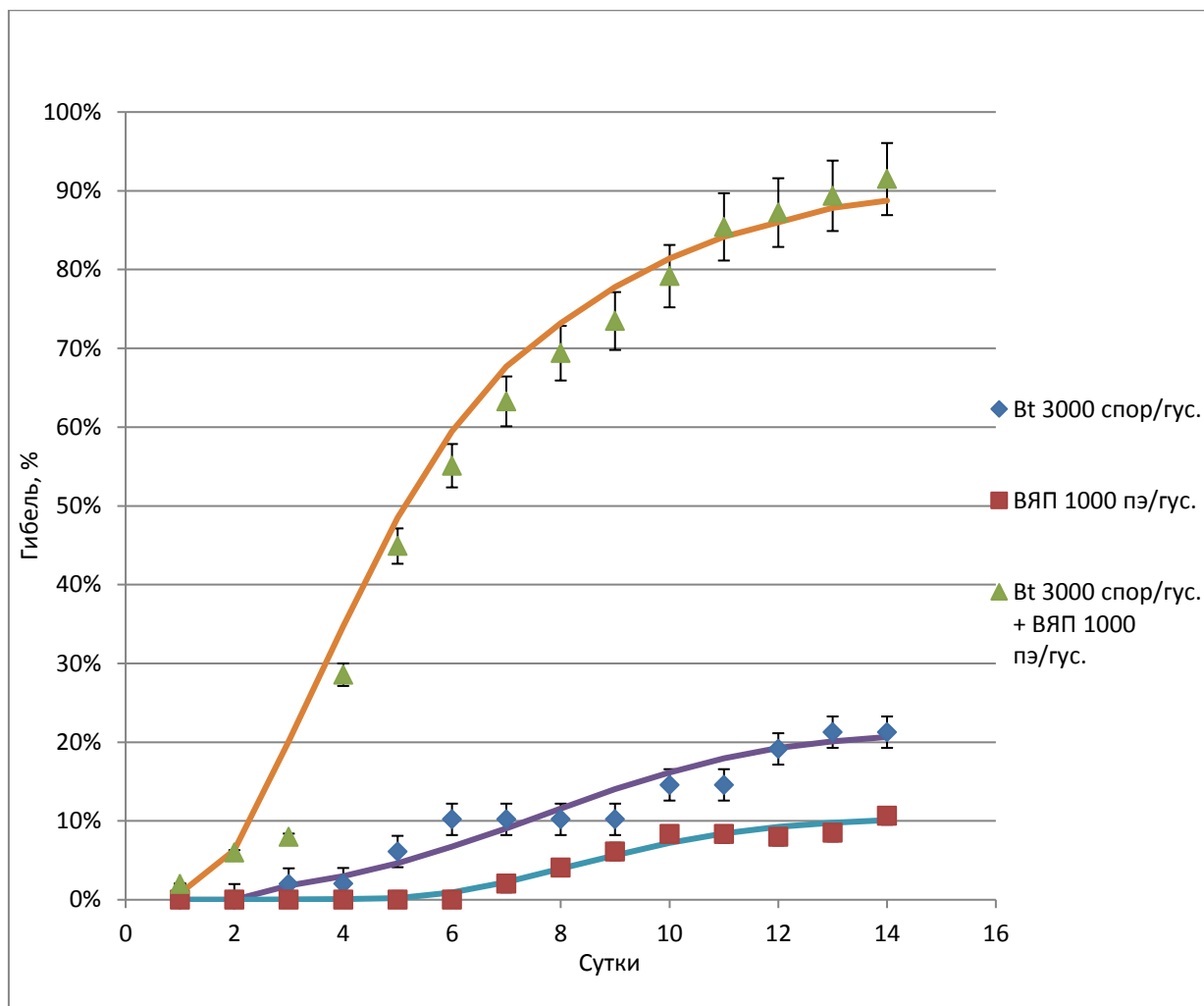


Рисунок 9. Динамика гибели непарного шелкопряда после заражения вирусным и бактериальным агентом, а также их композицией, %

При использовании рабочей, достаточно высокой концентрации бактериальной суспензии 5×10^7 спор/мл массовая гибель гусениц НШ наступала уже после 4-х сут (табл. 10). Однако применяя в полевых условиях такие концентрации агента высок риск поражения полезных насекомых-опылителей. Помимо этого значительные концентрации Bt могут спровоцировать антифидантный эффект, в случае наступления которого, биологическая защита посредством использования энтомопатогенных бактерий

станет неэффективна. Это связано с тем, что насекомые перестают употреблять фитомассу, обработанную препаратом, таким образом, можно получить расползание очага и свести все природоохранные мероприятия на «нет».

Таблица 10

Динамика гибели гусениц непарного шелкопряда (в %) после их инфицирования суспензиями *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* и ВЯП НШ в различных концентрациях и их смесью

Сутки	Суспензия <i>Bacillus thuringiensis</i>	Смесь бактериальной и вирусной суспензий	Вирусная суспензия
	5×10^7 спор/мл	3×10^5 спор/мл + 10^5 пэ/мл	10^7 пэ/мл
1	4,8±1,8	2,1±1,0	0
2	21,2±7,0	6,2±1,2	0
3	38,6±11,4	8,1±1,5	0
4	52,7±13,4	29,2±2,1	0
5	63,7±14,8	45,6±2,6	0
6	72,0±16,0	55,7±2,6	0,0±0,3
7	78,0±17,2	63,5±2,8	5,2±0,9
8	82,7±2,0	69,7±3,1	21,0±2,1
9	86,2±1,9	73,0±2,9	46,0±3,4
10	88,8±2,1	79,0±3,1	70,6±4,2
11	91,0±2,3	85,2±3,3	86,8±3,6
12	92,6±2,5	87,2±3,5	95,1±2,5
13	93,9±2,7	89,8±3,6	98,4±1,4
14	94,9±2,8	91,9±3,7	99,6±0,7

После заражения ВЯП с концентрацией 10^7 пэ/мл гибель гусениц достаточно высока к 14 суткам и составляет 85-99 %.

Для комбинации двух агентов наблюдалось последовательное действие. Смесь вирусной и бактериальной суспензии приводила к высокому проценту гибели насекомых, несмотря на сниженные концентрации. Также у данного сочетания агентов наблюдалась схожесть в динамике гибели с группой с концентрацией 5×10^7 спор/мл. При сравнении с вирусными группами у

комбинированной суспензии высокий процент погибших насекомых фиксировался намного раньше (табл. 10).

Для определения эффективности использования смешанной инфекции в естественных условиях были проведены полевые эксперименты с использованием вирусно-бактериальной смеси. При этом расход вируса составил 4×10^9 пз/га, а бактерий 6×10^{11} спор/га.

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 хвой 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 (рис. 10).

Для оценки эффективности проведенных защитных мер использовали метод глазомерной оценки степени дефолиации крон с использованием контрольного участка, описанный в работе (Гниненко Ю.И. и др., 2015).

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. 11).

Таблица 11

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



Рисунок 10. Полевые испытания с использованием аэрозольной установки ГАРД на базе автомобиля Урал-4320 (Республика Алтай, 2017 г.)

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

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.

Повторное обследование, проведенное весной 2018 г., показало, что в радиусе 10 км от места обработки НШ встречается крайне редко, в тоже время, на расстоянии 50 км от места обработки, численность вредителя была значительной и требовала принятия мер по защите леса.

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 объёмов 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 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 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 ($\text{ЛВ}_{50}=216$ ч, $\text{ЛД}_{50}=1,6 \times 10^2$ 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 – ЛВ_{50} 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 литературы

1. Андреева И.В., Джалилов Ф.С. Биологическая защита растений. – М.: Колос. – 2004. – 264 с.
2. Ашимов К.С. Биология, экология и динамика численности непарного шелкопряда в орехово-плодовых лесах Южной Киргизии: автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1989. 24 с.
3. Баранчиков Ю.Н., Кравцов Б.А. Опыт морфометрического анализа географических популяции непарного шелкопряда по совокупности признаков // Пространственно-временная структура лесных биогеоценозов. Новосибирск, 1981. С. 96-112.
4. Баранчиков Ю.Н. Трофическая специализация чешуекрылых. Красноярск, 1987. 171 с.
5. Бахвалов С.А. Биологическое подавление популяции шелкопряда монашенки в Западной Сибири: опыт применения и анализ результатов // Сиб. экол. журн. – 1995. – Вып. 2. – № 5. – С. 466-473.
6. Бахвалов С.А. Вирозы насекомых. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты: под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. С. 20-75.
7. Бахвалов С.А., Бахвалова В.Н. Влияние корма на чувствительность непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) к вирусу ядерного полиэдроза // Вопросы вирусологии. – 2009. – № 4. – С. 39–42.
8. Бахвалов С.А., Мартемьянов В.В., Подвайт Д. Сравнительная характеристика биологической активности вирусных препаратов Вирин-ЭНШ и Джипчек (Gurpcek) // Евразийский энтомологический журнал. – 2005. – Т. 4. – № 3. – С. 183–186.
9. Бахвалов С.А., Тешебаева З.А., Бахвалова В.Н., Мартемьянов В.В. Сравнительное изучение распространения и биологической активности вируса ядерного полиэдроза в природных популяциях непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) на территории Западной Сибири и Кыргызстана // Евразийский энтомологический журнал. – 2010. – Т. 9. – Вып 1. – С. 1–6.

10. Бенкевич В.И. Массовые появления непарного шелкопряда в европейской части СССР. М.: Наука, 1984. 142 с.
11. Берриман А. Защита леса от насекомых-вредителей / А. Берриман: пер. с англ. В.Г. Долгополова. М.: Агропромиздат, 1990. 288 с.
12. Бойчук Ю.Д., Злотин А.З. Принципы и методы отбора исходного материала для культивирования насекомых // Успехи соврем. биол. – 1999а. – Т. 119 – № 6. – С. 590-598.
13. Бойчук Ю.Д., Злотин А.З. Формирование стартовой колонии непарного шелкопряда при его лабораторном разведении // Лесное хозяйство. – 1999б – № 3. – С. 49-50.
14. Вайшер Б., Браун Д. Знакомство с нематодами. Общая нематодология. – София-М., 2001.
15. Вейзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. М.: Колос, 1972. 640 с.
16. Вейзер Я., Бриггс Д.Д. Определение патогенов. Микроорганизмы в борьбе с вредными насекомыми и клещами: под ред. М.С. Гилярова. М.: Колос, 1976. С.17-53.
17. Верещагина В.В. Роль света в поведении и распределении непарного шелкопряда и дубовой листовёртки в условиях полезащитных лесных полос // Зоол. журн. – 1952. – Т.31 – Вып. 1. – С. 25-32.
18. Викторов Г.А. Колебания численности насекомых как регулируемый процесс // Журн. общ. биол. – 1965. – Т. 26 – № 1. – С. 43-55.
19. Воронцов А.И. Лесная энтомология: Учебник для студентов лесохозяйств. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1982. 384 с.
20. Воронцов А.И., Голубев А.В., Мозолевская Е.Г. Современные методы учета и прогноза хвое-листогрызущих насекомых // Тр. Всес. энтомол. об-ва. – 1983. – Т. 65. – С. 4-19.
21. Вшивкова Т.А. Интенсивность развития и питания гусениц непарного шелкопряда при различной плотности экспериментальной популяции // Биоценотические группировки таежных животных. Красноярск, 1978. С. 54-66.

22. Вязников А.Н., Соколов Г.И. История лесного хозяйства и лесоводы Челябинской области. В 2 т. Челябинск: «Каменный пояс», 2006. 504 с.
23. Ганиев М. М., Недорезков В. Д. Химические средства защиты растений. — М.: КолосС, 2006. 248 с.
24. Глупов В.В., Бахвалов С.А. Механизмы резистентности насекомых при патогенезе // Успехи современной биологии. — 1998. — Вып. 4. — Т. 118. — С. 466-48.
25. Гниненко Ю.И. Вспышки массового размножения лесных насекомых в Сибири и на Дальнем Востоке в последней четверти XX века // Лесохоз. Информ. — 2003. — № 1. — С. 46-57.
26. Гулий В.В., Теплякова Т.В., Иванов Г.М. Микроорганизмы полезные для биометода. — Новосибирск: Наука, 1981. 172 с.
27. Гулий В.В., Штерншис М.В., Северина Н.И. Поиск путей повышения эффективности вирусных препаратов. // В кн.: Микробиологические методы борьбы с вредителями растений. — Новосибирск. — 1977. — С. 5–15.
28. Гулий В.В., Рыбина С.Ю. Вирусные болезни насекомых и их диагностика. Кишинёв: Штиинца, 1988. 125 с.
29. Данилов Л.Г., Айрапетян В.Г., Антонова И.А., Нашекина Т.Ю., Турицин В.С. Технология производства и применения биопрепаратов на основе энтомопатогенных нематод. // Главный агроном. — 2006. — № 9. — С. 20-25.
30. Долженко, В.И. Методические указания по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, моллюскоцидов и родентицидов в сельском хозяйстве / В.И. Долженко, Г.И. Сухорученко, В.И. Танский, В.Н. Буров, Л.А. Буркова, С.В. Васильев, В.Б. Митрофанов, А.К. Лысов. — СПб.: Изд-во Всерос. НИИ защиты растений, 2004. 363 с.
31. Евлахова А.А. Энтомопатогенные грибы. Систематика, биология, практическое значение. — Л.: Наука, 1974. 260 с.
32. Злотин А.З. Техническая энтомология. Справочное пособие. — Киев: Наукова думка, 1989. 184 с.

33. Злотин А.З., Лымарева М.А., Гремль А.Г. Развитие непарного шелкопряда *Ocneria dispar* L. в лабораторных условиях при кормлении желудями // Зоологический журнал. – 1965. – № 44,7. – С.14-16.
34. Знаменский В.С., Лямцев Н.И. Влияние плотности популяции на качественные показатели динамики численности непарного шелкопряда // Защита леса от вредителей и болезней. М., 1980. С. 21-39.
35. Знаменский В.С., Лямцев Н.И. Индикаторы массового размножения непарного шелкопряда // Лесное хоз-во. – 1985. – № 2. – С. 60-62.
36. Зиновьева Л.А., Захарченко И.С. Полусинтетическая питательная среда для гусениц непарного шелкопряда // Научные труды МЛТИ. М., 1974. С. 164-170.
37. Зинченко, В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность : [учеб. пособие] / В.А. Зинченко .— 2-е изд., перераб. и доп. — М. : КолосС, 2012. 248 с.
38. Ильинский А.И., Тропин И.В. Надзор, учет и прогноз массовых размножений хвое-листогрызущих насекомых в лесах СССР. М., 1965. 284 с.
39. Ильиных А.В. Оптимизированная искусственная питательная среда для культивирования непарного шелкопряда // Биотехнология. — 1996. — № 7. — С. 42—43.
40. Ильиных А.В. Методика культивирования непарного шелкопряда в лабораторных условиях // Биотехнология. – 1997а. – № 9, 10. –С. 27-29.
41. Ильиных А.В. Эпизоотология бакуловирусов // Изв. РАН. Сер. Биол. – 2007. – № 5. – С.524-533.
42. Ильиных А.В., Кузьминов С.В., Ульянова Е.Г., Ильиных Ф.А., Кожоев Ш.С. Полиэдроз в популяциях непарного шелкопряда и шелкопряда монашенки // Защита и карантин растений. – 2005. – № 3. – С.53-54.
43. Ильиных А.В., Куренщиков Д.К., Бабурин А.А., Имранова Е.Л. Факторы влияющие на продолжительность вспышки массового размножения непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) на территории Дальнего Востока // Экология. – 2011. – № 3. – С. 211-216.

44. Ильиных А.В., Куренщиков Д.К., Бабурин А.А., Имранова Е.Л. К причинам затухания вспышек массового размножения непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) на территории Дальнего Востока // Известия СПОЛТА. – 2009. – Вып. 187. – С. 131-139.
45. Ильиных А.В., Петрова И.Д. Роль полиэдроза в динамике численности непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) в различных частях его ареала // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. СПб.: СПбГЛТА. – 2008. – Вып. 182. – С. 139-145.
46. Ильиных А.В., Чуйкова Г.В., Идентификация природных изолятов вируса ядерного полиэдроза шелкопряда-монашенки (*Lymantria monacha* L.) // Вопр. Вирусологии. – 1989. – № 1. – С. 84-89.
47. Ильиных А.В., Ульянова Е.Г. Латентность бакуловирусов // Изв. РАН. Сер. Биол. – 2005. – № 5. – С. 599-606.
48. Кизирия Н.Г. Обоснование совместного использования микробиологических препаратов в борьбе с непарным шелкопрядом // Лесохозяйственная информация. – 1992. – № 7. – С.32-33. – С. 83-84.
49. Кожурин С. И., Шутов В. В., Ермушин М. В., Метельков В. И. История лесного дела в России. — Кострома: КГТУ, 2004. 72 с.
50. Колтунов Е.В., Пономарев В.И., Федоренко С.И. Экология непарного шелкопряда в условиях антропогенного воздействия. Екатеринбург: Уро РАН, 1998. 212 с.
51. Колтунов Е.В., Пономарев В.И., Федоренко С.И. О введении карантина против азиатской расы непарного шелкопряда // Лесное хозяйство. – 2001. – № 4. – С. 43-46.
52. Колтунов Е.В. Экология непарного шелкопряда в лесах Евразии. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 232с.
53. Космачевский А.С., Осенняя Т.А., Ярошенко В.А. Применение вируса полиэдроза и гранулеза против американской белой бабочки // Патогенные микроорганизмы вредителей растений: материалы симпозиума / Рига, 1972.

54. Лисенков, А.Н. Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов / А.Н. Лисенков. – М.: Медицина, 1979.
55. Лиховидов В.Е. Опыт применения Вирина НШ в борьбе с непарным шелкопрядом в лесах Юго-Западной части СССР // Микроорганизмы в защите растений. – Кишинев: Тимпул. – 1984. – С. 15–20.
56. Лямцев Н.И., Дмитриева И.В. Влияние солнечной активности на изменение численности непарного шелкопряда // Биофизика. – 1998. – Т. 43. – Вып. 4. – С. 603-609.
57. Лямцев Н.И., Исаев А.С., Зукерт Н.В. Влияние климата и погоды на динамику численности непарного шелкопряда в Европейской России // Лесоведение. – 2000. – № 1. – С. 62-67.
58. Максимова Ю.В. Биологические методы защиты леса. Учебное пособие. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2014. – 172 с.
59. Марков В.А. Миграции как фактор динамики численности массовых видов листо- и хвоегрызущих насекомых // Зоол. журн. – 1999. – Т. 78 – № 1. – С. 49-56.
60. Марушина Н.Г., Ашимов К.С. Непарный шелкопряд в орехоплодовых лесах Южной Киргизии // Вопросы защиты леса. – 1984. – Вып. 156. – С. 91-97.
61. Монастырский А.Л., Горбатовский В.В. Массовое разведение насекомых для биологической защиты растений – М.: Агропромиздат, 1991. 240 с.
62. Питательная среда для разведения гусениц непарного шелкопряда: пат. 577001 СССР. № 2365213/30-15: заявл. 29.03.76; опубл. 25.10.77, бюл. 39.
63. Питательная среда для разведения гусениц насекомых: пат. 884643 СССР. № 2950040/30-15: заявл. 02.07.80; опубл. 30.11.81, бюл. 44.
64. Питательная среда для гусениц лесных насекомых-фитофагов: авторское свидетельство СССР № 1824126, МПК А01К 67/00, опубл. 30.06.1993 г.
65. Питательная среда для разведения гусениц насекомых, в частности гусениц непарного шелкопряда: авторское свидетельство СССР № 884643, МПК А01К67/00, опубл. 30.11.1981 г.

66. Пономарев В.И. Экологические и популяционно-генетические особенности непарного шелкопряда. Екатеринбург: Наука, 1992. 60 с.
67. Пономарев В.И. Популяционно-генетические особенности вспышек массового размножения непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) // Экология. – 1994а. – № 5. – С. 81-82.
68. Пономарев В.И. Несколько замечаний к экологии зауральской популяции непарного шелкопряда // Лесопатологическая обстановка в лесном фонде Уральского региона. Екатеринбург, 2001. С. 94-104.
69. Пономарев В.И., Ильиных А.В., Гниненко Ю.И., Соколов Г.И., Андреева Е.М. Непарный шелкопряд в Зауралье и Западной Сибири. Екатеринбург, 2012. 321 с.
70. СОП № 2-029 «Приготовление искусственной питательной среды для культивирования гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.)»
71. СОП № 2-030 «Определение биологической активности вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.)»
72. СОП № 2-031 «Культивирование гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.)»
73. СОП № 2-032 «Культивирование имаго непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) в лабораторных условиях»
74. Рафес П.М. Биологические исследования растительноядных лесных насекомых. М.: Наука, 1980. 168 с.
75. Саулич А.Х. Сезонное развитие насекомых и возможности их расселения. Спб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 1999. 248 с.
76. Сикура А.И., Красницкая Р.С. Усиление действия вируса гранулеза американской белой бабочки *Huphantria cunea* Drury. путем использования смешанной инфекции // Патогенные микроорганизмы вредителей растений: сборник/ Рига: «Зинатре», 1972. С. 90-92
77. Сироткин В.Н. Значение биотических факторов в динамике численности непарного шелкопряда // Защита леса в Башкирии. Уфа, 1981. С. 30-32.

78. Способ получения тест-гусениц непарного шелкопряда и питательные среды для получения тест-гусениц непарного шелкопряда природной кладки и гусениц младших и старших возрастов лабораторной выкормки: пат. 577001 СССР. № 1209131: заявл. 05.07.83; опубл. 07.02.86, бюл. 5.
79. Старец В.А., Менчер В.М. Мнтод оптимизации рецептов полусинтетических питательных сред для разведения насекомых-фитофагов *Amathes C-nigrum* L. (Lepidoptera, Lymantriidae) // Зоол. журн. – 1980. –Т. 59, Вып. 5. – С. 771-776.
80. Старец В.А. Методы разведения совок фитофагов на искусственных питательных средах – Кишинев: Госкомцен, 1981. 13 с.
81. Тамарина Н. А. Основы технической энтомологии. — М.: Изд-во МГУ, 1990. 202 с.
82. Таран И.В., Кабалин С.И., Бех И.А. , Платалис А.Э. Леса и лесное хозяйство в Новосибирской области. Новосибирск: Наука, 1979. 270 с.
83. Турицин В.С. Экологические особенности реализации биологической активности энтомопатогенных нематод (Nematoda: Steinernematidae) для контроля численности вредных насекомых. – Автореф. дис. канд. биол. наук. – Санкт-Петербург. – 2010. – 18 с.
84. Цветаева И.А. Питательные среды // Защита растений. – 1976. –№ 3. – С. 27.
85. Чухрий М.Г. Биология бакуловирuсов и вирусuв цитоплазматического полиэдроза. Кишинёв: Штиинца, 1982. 48с.
86. Шагов Е.М., Новикова А.К. Особенности формирования культур насекомых с заданными свойствами в условиях техноценоза // Сельскохозяйственная биология. – 1985. – № 6. – С. 86–89.
87. Штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда, используемый для получения инсектицидов: пат. 2117701 Рос. Федерации. № 96115819: заявл. 31.07.96; опубл. 20.08.1998.
88. 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, опубликован в бюллетени № 22 от 31.07.2018 г.

89. Штерншис М.В. Биологический контроль численности насекомых // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. Под ред. В.В.Глунова. – М.: Круглый год. – 2001. – С. 562-610.

90. Штерншис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В., Томилова О.Г. Биопрепараты в защите растений. Учебное пособие / Мин-во сел. Хоз-ва РФ. Новосиб. гос. аграр. Ун-т – Новосибирск, 2000. 128 с.

91. Штерншис М.В., Андреева И.В., Цветкова В.П. Проблемы оптимизации энтомопатогенных биопрепаратов для защиты растений // Вестник НГАУ. – 2011. – №1(17). – С.7-13.

92. Штерншис М.В., Ермакова Н.И., Цветкова В.П. Возможности подавления численности лугового мотылька энтомопатогенами // Интродукция микроорганизмов в окружающую среду: материалы конференции / М., 1994. С.115-117.

93. Эдельман Н.М. Выращивание фитофагов с различными типами питания на питательных средах с проростками бобовых // Труды ВИЗР. Л. – 1974. – Вып. 40. –С. 128-134.

94. Яхонтов В.В. Экология насекомых. М.: Высшая школа, 1969. 187 с.

95. Adams J.R. Introduction and classification of viruses of invertebrates. J.R. Jams: eds. J.R Adams, J.R. Bonami // Atlas of invertebr. viruses. Boca Raton.: CRC Press, 1991. P.1-8.

96. Bauer L.S., Muller D.L., Maddox J.V., McManus M.L. Interaction between a *Nosema* sp. (*Microspora: Nosematidae*) and nuclear polyhedrosis virus infecting the gypsy moth, *Lymantria dispar* (*Lepidoptera: Lymantriidae*) // J. Invertebr. Pathol. – 1998. – Vol.74. – P.147-153.

97. Bergold G.H. The nature of nuclear-polyhesrosis virus // Insect Pathology. New York, 1963. P. 413-456.

98. Betz F.S., Hammond B.G., Fuchs R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2000. – № 32 – P. 156–173.
99. Brown A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review // J. Am. Mosq. Control Assoc. – 1986. – №. 2. – P. 123–140.
100. Burden J.P., Griffiths C.M., Cory J.S., Smith P., Sait S.M. Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* // Molecul. Ecol. – 2002. – V.11. – P. 547-555.
101. Bulla L.A., Bechtel D.B., Kramer K.J., Shethna Y.I., Aronson A.I., Fitz-James P.C. Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis* // Crit Rev Microbiol. – 1980. – № 8 – P. 147–204.
102. Bulla L.A, Rhodes RA, St Julian G. Bacteria as insect pathogens // Annu Rev Microbiol. – 1975. – № 29– P. 163–190.
103. Burden J.P. , Nixon C.P., Hodgkinson A.E., Rossee R.D., Sait S.M., King L.A., Hails R.S. Covert infections as a mechanism for long-term persistence of baculoviruses // Ecol. Letters – 2003. – V. 6. – P. 524-531.
104. Cabodevilla O., Ibanez I., Simon O., Murillo R., Caballero P., Williams T. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus // Biol. Control. – 2011. – V.56. – P. 184 - 192.
105. Cooper D., Cory J.S., Myers J.H. Hierarchical spatial structure of genetically variable nucleopolyhedrovirus infecting cyclic populations of western tent caterpillars // Mol. Ecol. – 2003a. – V. 12. – P. 881-890.
106. Daoust R.A., Gunner H.B. Microbial synergists pathogenic to *Lymantria dispar*: Chitinolytic and fermentative bacterial interactions // J. Invert. Pathol. – 1979. – V. 33. – P. 368-377.
107. Demir İ., Eryüzlü E., Demirbağ Z. A study on the characterization and pathogenicity of bacteria from *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) // Turk. J. Biol. – 2012. – V. 36. – P. 459-468.

108. Eastwell K.C., Cossentine J.E., Bernardy M.G. Charakterisation of *Cydia pomonella* granulovirus from codling moths in a laboratory colony and in orchards of British Columbia // *Ann. App. Biol.* – 1999. – V. 134. – P. 285–291.
109. Elkinton J.S., Liebhold A.M. Population dynamics of gypsy moth in North America // *Ann. Rev. Entomol.* – 1990. – V. 35. – P. 571-96.
110. Evans H., Shapiro M. Viruses // *Manual of techniques in insect pathology*: ed. L. Lacey. San Diego. Toronto: Acad. Press, 1997. P.17-53.
111. Fuxa J.R., Richter A.R. Selection for an increased rate of vertical transmission of *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera: Noctuidae*) nuclear polyhedrosis virus // *Environ. Entomol.* – 1991. – V. 20. – P. 603-609.
112. Fuxa J.R., Richter A.R. Lack of vertical transmission in *Anticarsia gemmatilis* (*Lepidoptera: Noctuidae*) nuclear polyhedrosis virus, a pathogen not indigenous to Louisiana // *Environ. Entomol.* – 1993. – V. 22. – P. 425-431.
113. Ilyinykh A.B., Shternshis M.V., Kuzminov S.V. Exploration into a mechanism of transgenerational transmission of nucleopolyhedrovirus in *Lymantria dispar* L. in Western Siberia // *BioControl.* – 2004. – V.49. – P. 441-454.
114. Ilyinykh A.B. Epizootiology of Baculoviruses // *Biol. Bull.* – 2007. – V. 34. – № 5. – P. 434-441.
115. Ilyinykh A. Analysis of the causes of declines in Western Siberian outbreaks of the nun moth, *Lymantria monacha* // *BioControl.* – 2011. – V.56. – P. 123-131.
116. Keating K.A., Hunter M.D., Shults J.C. Leaf phenolic inhibition of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus. Role of polyhedral inclusion body aggregation // *J. Chem. Ecol.* – 1990. – V. 16. – № 5. – P. 1445-1457.
117. Knaak, N., Fiuza, L.M. Biological control potential of entomopathogenic viruses // *Microbial Insecticides: Principles and Applications.* – 2011. – P. 257–280.
118. Kuzio J., Pearson M.N., Harwood S.H., Funk C.J., Evans J.T., Slavicek J.M., Rohrmann G.F. Sequence and Analysis of the Genome of a Baculovirus Pathogenic for *Lymantria dispar* // *Virology.* – 1999. – V. 253. – P. 17-34.

119. Leonard D.E., Doane C.C., // An Artificial Diet for the Gypsy Moth, *Porthelria dispar* (*Lepidoptera: Lymantriidae*) // Ann: Entomol. Soc. Am. – 1966. – V. 59. – № 3. – P. 1462-146.
120. Lewis F.B., Rollinson W.D. Effects of storage on the virulence of gypsy moth nucleopolyhedrosis inclusion bodies // J. Econ. Entomol. – 1978. – V. 34. – № 4. – P. 33-34.
121. Liebhold A., Elkinton J., Williams D., Muzika R.-M. What causes outbreaks of the gypsy moth in North America // Popul. Ecol. – 2000. – V. 42. – P. 257-266.
122. Murray K., Elkinkton J.S. Environmental contamination of egg masses as a major component of transgeneration transmission of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus (LdMNPV) // J. Invert. Pathol. – 1989. – V. 53. – P. 324-334.
123. Myers J.H. Can a general hypothesis explain population of forest Lepidoptera // Adv. Ecol. Res. – 1988. – V. 18. – P. 179-284.
124. Myers J.H., Rotman L. Virulence and transmission of infectious diseases in humans insects: evolutionary and demographic patterns // Tree. – 1995. – V. 10. – P. 194-198.
125. Myers J., Malakar H.R., Cory J.S. Syblethal nucleopolyhedrovirus infection effects on female pupal weight,egg mass size, and vertical transmission in gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) // Environ. Entomol. – 2000. – V. 29. – P. 1268-1272.
126. Matthews H.J., Smith I., Edwards J.P. Lethal and sublethal effects of granulovirus on the tomato moth // J. Invert. Pathol. – 2001. – V. 80. – P. 73-80.
127. Millar L.C., Barbercheck M.E. Effects of tillage practices on entomopathogenic nematodes in a corn agroecosystem // Biological control. – 2002. – № 25– P. 1–11.
128. Novotny J. The use of nucleopolyhedrosis virus (NPV) and microsporidia in the control of the gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) // Folia parasitologica. –1988. – Vol. 35 – № 3. – P.199-208.
129. Podgwaite J.D., Mazzone H.M. Latency of insect viruses // Adv. Virus Res. – 1986. – V. 31. – P. 293-320.

130. Schonherr J., Ketter R. Zur Frage der kombinierten anwendung von polyedervirus und *Bacillus thuringiensis* bei der none *Lymantria monacha* L. (*Lepidoptera*) // Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz. – 1979. – Bd. 86. –H. 8. – S. 483-498.
131. Salminen J. P., Ossipov V., Haukioja E., Pihlaja K. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens* // Phytochemistry. – 2001. – № 57. – P. 15-22.
132. Shapiro M., Robertson J.L., Ynjac M.G., Katagiri K., Bell R.A. Comparative infectivities of gypsy moth (*Lepidoptera*: *Lymantriidae*) nucleopolyhedrosis virus isolates from North America, Europe and Asia // Econ. Entomol. – 1984. – V. 77. – № 1. – P. 153-156.
133. Stairs G.R. The effect of metamorphosis on nuclear polyhedrosis virus infection on certain *Lepidoptera* // Can. J. Microbiol. – 1965. – V. 11. – P. 509-512.
134. Teakle R.E., Burne V.S. Nuclear polyhedrosis virus production *Heliothis armigera* infected at different larval ages // J. Invertebr. Pathol. – 1989. – V. 53. – № 1. – P. 21-24.
135. Vago C., Aizawa K., Ignoffo C., Martignoni M.E. Editorial: Present status of the nomenclature and classification of invertebrate viruses // J. Invertebr. Pathol. – 1974. – № 2– P. 133–134.
136. Vilaplana L., Wilson K., Redman E. M., Cory J. S. Pathogen persistence in migratory insects: high levels of vertically-transmitted virus infection in field populations of the African armyworm // Evol. Ecol. – 2010. – V. 24. – P. 147-160.
137. Volkman L.E. Nucleopolyhedrovirus interaction with their insect hosts // Adv.Virus Res. – 1997. – V. 48. – P. 313-348.
138. Weseloh R.M., Andreadis T.G. Laboratory assessment of forest microhabitat substrates as sources of the gypsy moth nuclear polyhedrosis virus // J. Invert. Pathol. – 1996. – V. 48. – P. 27-33.
139. Yahner R.H., Smith H.R. Small mammal abundance and habitat relationshipson deciduous forested sites with different susceptibility to gypsy moth defoliation // Environ. Manage. – 1991. – V. 15. – P. 113-120.

140. Yamao M., Katayama N., Nakazawa H., Yamakawa M., Hayashi Y., Hara S., Kamei K., Mori H. Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus // *Genes & Dev.* – 1999. – V. 13. – P. 511-516.
141. Young, S.Y. Effect of nuclear polyhedrosis virus in -larvae on post larval stage and dissemination of adults // *J. Invert. Pathol.* – 1990. – V. 55. – P. 69-75.
142. Zarins I., Jankevica L. Entomopathogenic viruses and their potential use in forest pest control in Latvia // *Mezzinatne.* – 2010. – Vol. 22. – I. 55. P. – 19-46.

Приложение А. Патенты



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2 662 960⁽¹³⁾ C1(51) МПК
C12N 1/00 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(52) СПК
C12N 1/00 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017143083, 08.12.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.12.2017Дата регистрации:
31.07.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.12.2017

(45) Опубликовано: 31.07.2018 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора,
зав. патентным отделом Мистюрину Ю.Н.

(72) Автор(ы):

Колосов Алексей Владимирович (RU),
Моисеева Анастасия Алексеевна (RU),
Охлопкова Олеся Викторовна (RU),
Сафатов Александр Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии "Вектор"
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека (ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора) (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2117701 C1, 20.08.1998.КОЛОСОВ А.В., Разработка и испытания
вирусных энтомопатогенных препаратов
для защиты растений, автореферат
диссертации, Кольцово, 2011. SU 1638161 A1,
30.03.1991.(54) Штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L., используемый для
получения инсектицидного препарата

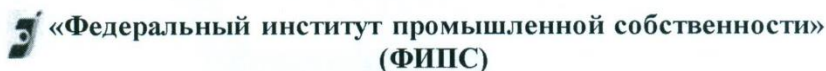
(57) Формула изобретения

Штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L. НШ-07, используемый для получения инсектицидного препарата и депонированный в государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под номером V-799.

RU 2 662 960 C 1

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

**Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение**



Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

27.03.2019	017151	2019108934
<i>Дата поступления</i>	<i>Входящий №</i>	<i>Регистрационный №</i>

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ <small>(при приеме документов заявки)</small> 27 MAR 2019		(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
<input type="checkbox"/> (8) ФИПС ОТДМ17 <small>(регистрационный номер международной заявки и даты международной подачи, установленные получающим ведомством)</small> <input type="checkbox"/> (87) <small>(номер и дата международной публикации международной заявки)</small> <input type="checkbox"/> (96) <small>(номер европейской заявки и даты ее подачи)</small> <input type="checkbox"/> (97) <small>(номер и дата публикации европейской заявки)</small>		(85) ДАТА ПЕРЕВОДА <small>международной заявки на национальную фазу</small>	
ЗАЯВЛЕНИЕ <small>о выдаче патента Российской Федерации на изобретение</small>		АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ <small>(почтовый адрес, фамилия и инициалы или наименование адресата)</small> 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, зав. патентным отделом Мистюрину Ю.П. Телефон: 383-363-47-00 доп. 18-84 Факс: Адрес электронной почты: mist@vector.nsc.ru АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ <small>(указывается при подаче заявки на секретное изобретение)</small>	
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Искусственная питательная среда для культивирования гусениц непарного шелкопряда <i>Lymantria dispar</i> L.		В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация	
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ <small>(фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (полностью определенному документу, место жительства или место нахождения, название страны и почтовый индекс))</small> Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), адрес: Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. <input type="checkbox"/> Изобретение создано за счет Заявитель является: <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком <small>исполнитель работ (указать наименование)</small> <input type="checkbox"/> исполнителем работ по: <input type="checkbox"/> контракту с <input type="checkbox"/> муниципальному контракту Контракт: №		ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ ОГРН 1055475048122 КПП 543301001 ИНН 5433161342 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия, номер) КОД СТРАНЫ (если он установлен) (RU)	
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(Ы) ЗАЯВИТЕЛЯ <small>(указывается фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) лица, имеющего право представлять заявителя для вступления в процесс патентного дела от его имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности или в установленном законом и в силу закона)</small> Фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) Адрес Срок представительства (если к заявке не приложено доверенность представителя заявителя, срок может не указываться)		<input type="checkbox"/> патентный поверенный <input type="checkbox"/> представитель по доверенности <input type="checkbox"/> представитель по закону Телефон: Факс: Адрес электронной почты: Регистрационный номер патентного поверенного	

ОТД 17

28 MAR 2019

240 60 15

Общее количество документов в листах	43	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	Мазур О.В.
Количество платежных документов	1	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу «www.fips.ru» в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»		

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ ПОЛУЧЕНО оригиналов документов заявки 27 МАР 2019	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу		
<input type="checkbox"/> (86) (регистрационный номер международной заявки и дата международной подачи, установленные получающим ведомством) <input type="checkbox"/> (87) (номер и дата международной публикации международной заявки) <input type="checkbox"/> (96) (номер евразийской заявки и дата ее подачи) <input type="checkbox"/> (97) (номер и дата публикации евразийской заявки)	АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ (почтовый адрес, фамилия и инициалы или наименование адресата) 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, зав. патентным отделом Мистюрину Ю.Н. Телефон: 383-363-47-00 доп. 18-84 Факс: Адрес электронной почты: mist@vector.nsc.ru АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ (заполняется при подаче заявки на секретное изобретение)	
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение	В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация	
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Искусственная питательная среда для культивирования гусениц непарного шелкопряда <i>Lymantria dispar</i> L		
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (согласно учредительному документу), место жительства или место нахождения, название страны и почтовый индекс) Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), адрес: Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово. <input type="checkbox"/> изобретение создано за счет Заявитель является: <input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком исполнитель работ (указать наименование) <input type="checkbox"/> исполнителем работ по: <input type="checkbox"/> контракту с <input type="checkbox"/> муниципальному контракту заказчик работ Контракт: №		ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ ОГРН 1055475048122 КПП 543301001 ИНН 5433161342 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия, номер) КОД СТРАНЫ (если он установлен) (RU)
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ (указываются фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) лица, назначенного заявителем своим представителем для ведения дел по получению патента от его имени в Федеральной службе по интеллектуальной собственности или являющегося таковым в силу закона)		<input type="checkbox"/> патентный поверенный <input type="checkbox"/> представитель по доверенности <input type="checkbox"/> представитель по закону
Фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) Адрес Срок представительства (если к заявлению приложена доверенность представителя заявителя, срок может не указываться)		Телефон: Факс: Адрес электронной почты: Регистрационный номер патентного поверенного

794

Федеральная служба по интеллектуальной
собственности

Федеральное государственное бюджетное
учреждение



«Федеральный институт
промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993
Телефон (8-499) 240- 60- 15. Факс (8-495) 531-63-18

Форма N 09 ИЗ-2018
091

зав. патентным отделом, Мистюнину Ю.Н.
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора
р.п. Кольцово
Новосибирская обл.
630559

На № 1502/1393 от 29.05.2019

Наш № 2019108934/10(017151)

При переписке просим ссылаться на номер заявки

Исходящая корреспонденция от 07.06.2019

УВЕДОМЛЕНИЕ

о рассмотрении ходатайства о проведении экспертизы заявки на изобретение по
существу

По результатам рассмотрения ходатайства о проведении экспертизы заявки
№2019108934/10(017151) по существу, поступившего 04.06.2019, уведомляем о том, что
экспертиза заявки по существу будет проведена в отношении 1 независимого(ых) пункта(ов)
формулы изобретения,

принятой к рассмотрению по результатам проведения формальной экспертизы.

Обращаем Ваше внимание на то, что:

соответствие размера уплаченной пошлины установленному размеру определяется на
дату поступления документов или материалов заявки, ходатайства, заявления, возражения (п.
7 Положения о пошлинах**).

Главный специалист
отдела учета патентных
пошлин ФИПС

Документ подписан электронной подписью
Сведения о сертификате ЭП
Сертификат
3E0C89003AAA81B249B00700A6FA58EC
Владелец Романова
Анна Валерьевна
Срок действия с 25.04.2019 по 08.02.2027


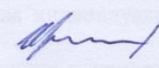
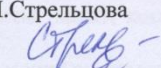
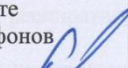
А. В. Романова
8(495) 531-65-37

1	ЭСЗ 04.06.2019	106035
---	----------------	--------



Приложение Б. Нормативная документация

Форма УД 007

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека			
Подразделение: Отдел биофизики и экологических исследований. Сектор бакуловирусных исследований.			Страница 1 из 3
Код документа: СОП № 2-029			
Версия: 01-19			
Название: Приготовление искусственной питательной среды для культивирования гусениц непарного шелкопряда (<i>Lymantria dispar</i> L.)			
Вводится впервые			
Дата введения в действие: <u>19.07.2019 г.</u>			
Отметка о ревизии: (результат ревизии, должность, ФИО, подпись лица, проводившего ревизию)			
(результат ревизии, должность, ФИО, подпись лица, проводившего ревизию)			
Составлена: Охлопкова О.В.  <u>« 15 » 07. 2019 г.</u>	Рассмотрена: Зав.отделом Сафатов А.С.  <u>« 15 » 07. 2019 г.</u>	Согласована: Зав. отделом обеспечения качества Е.Н.Стрельцова  <u>« 15 » 07. 2019 г.</u>	Утверждена: Зам. генерального директора по научной работе А.П.Агафонов  <u>« 16 » 07. 2019 г.</u>

1. Введение, цель

Данная стандартная операционная процедура (СОП) регламентирует процедуру приготовления искусственной питательной среды для культивирования гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) (ИПС).

2. Область применения

Настоящая СОП используется персоналом сектора бакуловирусных исследований для культивирования гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.).

3. Термины и обозначения

ИПС – искусственная питательная среда для культивирования гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.).

4. Пересмотр

Настоящая СОП разработана и вводится впервые.
Ревизия СОП должна проводиться каждые 5 лет.

5. Помещения

Процедура проводится в пом. № 207 сектора бакуловирусных исследований, корп. № 102.

6. Материалы и оборудование

Наименование сырья, реактивов, материалов	НД, страна, производитель
Аппарат (гомогенизатор) для приготовления ИПС	Китай, DEXP PL-0601
Весы лабораторные модель «AR1530» «Adventurer»	Швейцария, Ohaus
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Цилиндр мерный	ГОСТ 1770-74

Документ конфиденциальный

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека			
Подразделение: Отдел биофизики и экологических исследований. Сектор бакуловирусных исследований.			Страница 1 из 5
Код документа: СОП № 2-030			
Версия: 01-19			
Название: Определение биологической активности вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда (<i>Lymantria dispar</i> L.).			
Вводится впервые			
Дата введения в действие: <u>21.08.2019г.</u>			
Отметка о ревизии: _____ (результат ревизии, должность, ФИО, подпись лица, проводившего ревизию)			

Составлена: Охлопкова О.В. <u>«16» 08 2019 г.</u>	Рассмотрена: Зав.отделом Сафатов А.С. <u>«16» 08 2019 г.</u>	Согласована: Зав. отделом обеспечения качества Е.Н.Стрельцова <u>«19» 08.2019 г.</u>	Утверждена: Зам. генерального директора по научной работе А.П.Агафонов <u>«19» 08.19 г.</u>
Томилов А.А. <u>«16» 08 2019 г.</u>			
Колосов А.В. <u>«16» 08 2019 г.</u>			

1. Введение, цель

Данная стандартная операционная процедура (СОП) регламентирует процедуру определения биологической активности (ЛД50) вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда (ВЯП НШ).

2. Область применения

Настоящая СОП используется персоналом сектора бакуловирусных исследований отдела биофизики и экологических исследований.

3. Термины и обозначения

Центр – Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологий «Вектор».

НШ – непарный шелкопряд.

ВЯП НШ – вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда.

ЛД50 – средняя доза ВЯП НШ, вызывающая гибель половины испытуемой группы насекомых.

4. Пересмотр

Настоящая СОП разработана и вводится впервые.

Ревизия СОП должна проводиться каждые 5 года.

5. Помещения

Процедура проводится в пом.№ 505, корп.№ 5 отдела биофизики и экологических исследований.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека			
Подразделение: Отдел биофизики и экологических исследований. Сектор бакуловирусных исследований.			Страница 1 из 4
Код документа: СОП № 2-031			
Версия: 01-19			
Название: Культивирование гусениц непарного шелкопряда (<i>Lymantria dispar L.</i>) на искусственной питательной среде.			
Вводится впервые			
Дата введения в действие: <u>19.08.2019</u>			
Отметка о ревизии: _____ (результат ревизии, должность, ФИО, подпись лица, проводившего ревизию)			
_____ (результат ревизии, должность, ФИО, подпись лица, проводившего ревизию)			
Составлена: Охлопкова О.В. «15» 08 2019 г. Колосов А.В. «15.08» 2019 г.	Рассмотрена: Зав.отделом Сафатов А.С. «15» 08 2019 г.	Согласована: Зав. отделом обеспечения качества Е.Н.Стрельцова «15» 08 2019 г.	Утверждена: Зам. генерального директора по научной работе А.П.Агафонов «15» 08 2019 г.

1. Введение, цель

Данная стандартная операционная процедура (СОП) регламентирует процедуру культивирования гусениц непарного шелкопряда (НШ) на искусственной питательной среде (ИПС).

2. Область применения

Настоящая СОП используется персоналом сектора бакуловирусных исследований отдела биофизики и экологических исследований.

3. Термины и обозначения

Центр – Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологий «Вектор».

ИПС – искусственная питательная среда.

НШ – непарный шелкопряд.


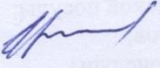
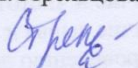
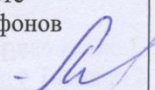
4. Пересмотр

Настоящая СОП разработана и вводится впервые.

Ревизия СОП должна проводиться каждые 5 лет.

5. Помещения

Процедура проводится в пом.№ 209, корп.№ 102 отдела биофизики и экологических исследований.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека			
Подразделение: Отдел биофизики и экологических исследований. Сектор бакуловирусных исследований.			Страница 1 из 4
Код документа: СОП № 2-032			
Версия: 01-19			
Название: Культивирование имаго непарного шелкопряда (<i>Lymantria dispar</i> L.) в лабораторных условиях.			
Вводится впервые			
Дата введения в действие: 19.08.2019г			
Отметка о ревизии:			
(результат ревизии, должность, ФИО, подпись лица, проводившего ревизию)			
(результат ревизии, должность, ФИО, подпись лица, проводившего ревизию)			
Составлена: Охлопкова О.В.  « 15 » 08 2019 г	Рассмотрена: Зав.отделом Сафатов А.С.  « 15 » 08 2019 г	Согласована: Зав. отделом обеспечения качества Е.Н.Стрельцова  « 15 » 08 2019 г	Утверждена: Зам. генерального директора по научной работе А.П.Агафонов  « 15 » 08 2019 г

1. Введение, цель

Данная стандартная операционная процедура (СОП) регламентирует процедуру культивирования имаго непарного шелкопряда (НШ) в лабораторных условиях.

2. Область применения

Настоящая СОП используется персоналом сектора бакуловирусных исследований отдела биофизики и экологических исследований.

3. Термины и обозначения

Центр – Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологий «Вектор».

НШ – непарный шелкопряд.

4. Пересмотр

Настоящая СОП разработана и вводится впервые.

Ревизия СОП должна проводиться каждые 5 лет.

5. Помещения

Процедура проводится в пом.№ 209, корп.№ 102 отдела биофизики и экологических исследований.

1. Материалы и оборудование

Таблица 1

Наименование реактивов, материалов	НД, страна, производитель
Эксикатор без крана	Э-190, ГОСТ 25336-86
Термостат	Тип ТС-80, ТУ 64-1-1382-83Е

Приложение В. Акты проведенных обследований и полевых испытаний

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА

ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР ЗАЩИТЫ ЛЕСА»
«ЦЕНТР ЗАЩИТЫ ЛЕСА АЛТАЙСКОГО КРАЯ»
(Филиал ФБУ «Рослесозащита» - «ЦЗЛ Алтайского края»)

Пролетарская ул., д. 61, Барнаул, 656056

Тел. 63-97-19, факс 63-97-19

Справка

Участки лесного фонда, рекомендованные для испытания эффективности новых биопрепаратов на территории Шебалинского лесничества Республики Алтай.

22.05.2017

г. Барнаул

На территории Шебалинского участкового лесничества Шебалинского лесничества, 17 мая 2017 года для испытания эффективности биопрепаратов были отобраны участки лесного фонда в районе Верх-Чергинского перевала (координаты: N. 51. 21'015'', E. 085. 29'329''. На отобранных участках непарный шелкопряд в кладках на скальных выступах на 50% еще не вылупился, а на 50% находился в «зеркальцах» на момент обследования. Также на стволах деревьев породы береза и лиственница отмечены единично гусеницы 1 возраста на высоте 1,5-2 метра. Из-за неблагоприятных погодных условий (заморозки) повреждения листьев не отмечено. Численность непарного шелкопряда на этих участках является очаговой.

Под обработку выбраны следующие участки: Кв.153 выд.12 (15,3 га); кв.131 выд.29 (3,1га); кв.139 выд.15 (3,3га); кв.139 выд.20 (1,2га); кв139 выд.13и14 (25,9га); кв154 выд.1 (26,3 га); кв140 выд.10 (1,8 га); кв140 выд.11 (1,0га); кв. 140 выд.2 (50,2га); кв140 выд. 4 (9,4га). Общая площадь выбранных участков составляет 137,5 га. Обработку рекомендуется провести по гусеницам 2-3 возраста.

Инженер-лесопатолог 1 категории



Ю.Е.Перунов.

УТВЕРЖДАЮ:

Министр природных ресурсов,
экологии и имущественных
отношений Республики Алтай
А.А. Алисов

АКТ

проведения обработки лесных насаждений от непарного шелкопряда
на территории Шебалинского лесничества
с. Шебалино 4 июня 2017 г.

Мы, нижеподписавшиеся, директор КУ РА «Шебалинское лесничество» Шипилина Т.Л., инженер Филиала ФБУ «Рослесозащита» - «ЦЗЛ Алтайского края» Журавлев И.Н. и заведующий сектором бакуловирусных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Колосов А.В. составили настоящий акт в том, что 4 июня 2017 года были проведены полевые испытания препарата «Вирин НШК» на территории Шебалинского лесничества, Шебалинского участкового лесничества в квартал 153 выдел 12, квартал 131 выдел 29, квартал 139 выдел 15 на общей площади 20 га.

Для обработки была использована баковая смесь: препарат «Лепидоцид, СК» (изготовитель ООО ПО «Сиббиофарм» партия № 130 (май 2017 года.)) в количестве 20 литров с титром не менее 10^{10} спор/мл и вирус ядерного полиэдроza непарного шелкопряда (ВЯП НШ) в количестве 2×10^{11} полиэдров. Для получения рабочего раствора к этой баковой смеси было добавлено 40 литров дистиллированной воды.

Обработка проведена наземным способом аэрозольной установкой ГАРД на базе автомобиля Урал-4320 предоставленного филиалом ФБУ «Рослесозащита» - «ЦЗЛ Алтайского края» 4 июня 2017 г. в период с 20 до 22 ч. на участке лесного фонда Шебалинского лесничества Шебалинского участкового лесничества, подобранного для испытания эффективности биопрепаратов специалистами лесничества и филиала ФБУ «Рослесозащита» - «ЦЗЛ Алтайского края». Численность непарного шелкопряда на этих участках является очаговой.

Подписи:

 Т.Л. Шипилина

 А.В. Колосов

 И.Н. Журавлев

АКТ

обследования лесных насаждений на территории Шебалинского лесничества после их обработки биологическим инсектицидом от непарного шелкопряда

с. Шебалино

9 июля 2017 г.

Мы, нижеподписавшиеся, директор КУ РА «Шебалинское лесничество» Шипилина Т.Л., лисничий Шебалинского участкового лесничества Белевцев А.А., заведующий сектором бакуловирусных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Колосов А.В. и старший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Колосова И.В. составили настоящий акт в том, что 9 июля 2017 года нами было проведено обследование лесных участков на территории Шебалинского лесничества, а именно: квартал 153 выдел 12, квартал 131 выдел 29, квартал 139 выделы 15 и 20, квартал 154 выдел 1. Целью обследования было обнаружение гусениц непарного шелкопряда и оценка дефолиации деревьев на вышеперечисленных.

В результате обследования было выявлено, что

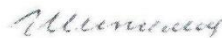
1. На участках квартал 153 выдел 12, квартал 131 выдел 29, квартал 139 выделы 15 гусеницы непарного шелкопряда отсутствуют, признаков дефолиации не обнаружено.
2. На участках квартал 139 выдел 20 и квартал 154 выдел 1 на деревьях имеются гусеницы непарного шелкопряда старших возрастов, дефолиация деревьев составляет от 50 до 70 %.

Ранее, 4 июля 2017 г., лесные участки квартал 153 выдел 12, квартал 131 выдел 29, квартал 139 выделы 15 были обработаны баковой смесью инсектицидов «Лепидоцид, СК» (изготовитель ООО ПО «Сиббиофарм» партия № 130 (май 2017 года.)) и вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда (ВЯП НШ) (см. Акт проведения обработки лесных насаждений от непарного шелкопряда территории Шебалинского лесничества от 4 июня 2017 г.). Выбор данных участков обусловлен рекомендацией инженера-лесопатолога Филиала ФБУ «Рослесозащита» - «ЦЗЛ Алтайского края» согласно справки от 22.05.2017 г.


Вывод:

Использование баковой смеси инсектицидов «Лепидоцид, СК» и ВЯП НШ против гусениц непарного шелкопряда достигших 2-3 возрастов позволяет эффективно контролировать численность этого вредителя леса и не допускать существенной дефолиации деревьев.

Подписи:



Т.Л. Шипилина



А.В. Колосов



И.В. Колосова



А.А. Белевцев

Министерство природных ресурсов и экологии Новосибирской области
Отдел лесных отношений по Кыштовскому лесничеству
632270, Новосибирская обл., Кыштовский р-н,
с. Кыштовка, ул. Сибирская, д.3
тел. (8-383-71) 21-192, e-mail: dlh-ksh@nso.ru

АКТ

проведения обследования придомовых, лесных участков на территории с.
Кыштовка
26 апреля 2019 г.

Мы, нижеподписавшиеся, глава администрации Кыштовского сельсовета Кыштовского района Новосибирской области Шипчин Н.В., начальник отдела лесных отношений по Кыштовскому лесничеству Пономарева Н.В. и младший научный сотрудник сектора бакуловирусных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Охлопкова О.В. составили настоящий акт в том, что 26 апреля 2019 г. нами было проведено обследование придомовых, лесных участков на территории с. Кыштовка, а именно: ул. Сибирская, д.9, ул. Павлодарская, д. 2а, 5, ул. Дорожная, д.10, ул. Полевая, д.4, ул. Журавкова, д.105, ул. Южная, д.14, ул. Волкова, д.71, ул. Целинная, д.64, ул. М.Чалтак, д.19, ул. Лесная, д.19. Целью обследования было обнаружение яйцекладок непарного шелкопряда на указанных территориях и количественная оценка обнаруженных яйцекладок.

В результате обследования было осмотрено несколько гектар придомовых, лесных участков, сняты показания по наличию яйцекладок с 310 модельных деревьев березы повислой на территории с. Кыштовка, выявлено, что:

1. На территории ул. Сибирская количество яйцекладок варьирует от 1 штуки до 30 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 10 яйцекладок;
2. На территории ул. Павлодарская, д.5 количество яйцекладок варьирует от 4 штук до 30 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 13 яйцекладок;
3. На территории ул. Дорожная количество яйцекладок варьирует от 5 штук до 50 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 13 яйцекладок;
4. На территории ул. Полевая количество яйцекладок варьирует от 4 штук до 30 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 12 яйцекладок;
5. На территории ул. Журавкова количество яйцекладок варьирует от 5 штук до 30 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 12 яйцекладок;

6. На территории ул. Южная количество яйцекладок варьирует от 3 штук до 15 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 8 яйцекладок;
7. На территории ул. Волкова количество яйцекладок варьирует от 3 штук до 12 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 6 яйцекладок;
8. На территории ул. Целинная количество яйцекладок варьирует от 2 штук до 9 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 3 яйцекладки;
9. На территории ул. М.Чалтак количество яйцекладок варьирует от 6 штуки до 30 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 13 яйцекладок;
10. На территории ул. Лесная количество яйцекладок варьирует от 7 штук до 23 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 13 яйцекладок;
11. На территории ул. Павлодарская, д. 2а количество яйцекладок варьирует от 3 штук до 15 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 7 яйцекладок.

Вывод:

На территории с. Кыштовка Кыштовского района Новосибирской области обнаружены яйцекладки непарного шелкопряда, пораженность яйцекладками деревьев в среднем фиксируется в диапазоне от 3 до 13 штук на одну березу. В целом объем яйцекладок обнаруженный на территории села можно классифицировать, как средний и значительный.

Рекомендации:


Разработать план интегрированной защиты растений с учетом особенностей территории. Провести инсектицидные обработки территории для снижения численности непарного шелкопряда в Кыштовском районе.

Подписи:

Глава
Кыштовского сельсовета

Начальник отдела
лесных отношений по
Кыштовскому лесничеству

М.н.с. сектора
бакуловирусных исследований
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



Шипчин Н.В.
Пономарева Н.В.
Охлопкова О.В.

Министерство природных ресурсов и экологии Новосибирской области
Отдел лесных отношений по Кыштовскому лесничеству
632270, Новосибирская обл., Кыштовский р-н,
с. Кыштовка, ул. Сибирская, д.3
тел. (8-383-71) 21-192, e-mail: dlh-ksh@nso.ru

АКТ

проведения обследования участка с многолетними насаждениями и
близлежащих к участку березовых колок
на территории с. Кыштовка
27 апреля 2019 г.

Мы, нижеподписавшиеся, глава администрации Кыштовского сельсовета Кыштовского района Новосибирской области Шипчин Н.В., начальник отдела лесных отношений по Кыштовскому лесничеству Пономарева Н.В. и младший научный сотрудник сектора бакуловирусных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Охлопкова О.В. составили настоящий акт в том, что 27 апреля 2019 г. нами было проведено обследование участка с многолетними насаждениями и близлежащих к участку березовых колок на территории с. Кыштовка. Общая территория участка составила 100 га. Целью обследования было обнаружение яйцекладок непарного шелкопряда на указанных территориях и количественная оценка обнаруженных яйцекладок.

В результате обследования было осмотрено несколько гектар территории участка, занятой березами, сняты показания по наличию яйцекладок с 95 модельных деревьев березы повислой на территории участка с многолетними насаждениями вблизи с. Кыштовка, выявлено, что:

1. На территории березовой колки № 1 количество яйцекладок варьирует от 3 штук до 25 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 10 яйцекладок;
2. На территории березовой колки № 2 количество яйцекладок варьирует от 3 штук до 15 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 6 яйцекладок;
3. На территории березовой колки № 3 количество яйцекладок варьирует от 3 штук до 7 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 5 яйцекладок;
4. На территории березовой колки № 4 количество яйцекладок варьирует от 4 штук до 15 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 7 яйцекладок;
5. На территории березовой колки № 5 количество яйцекладок варьирует от 2 штук до 10 штук на одно дерево, в среднем

пораженность одного дерева березы повислой составила 5 яйцекладок;

6. На территории березовой колки № 6 количество яйцекладок варьирует от 5 штук до 25 штук на одно дерево, в среднем пораженность одного дерева березы повислой составила 9 яйцекладок;

Вывод:

На территории участка с многолетними насаждениями вблизи с. Кыштовка Кыштовского района Новосибирской области обнаружены яйцекладки непарного шелкопряда, пораженность яйцекладками деревьев в среднем фиксируется в диапазоне от 5 до 10 штук на одну березу. В целом объем яйцекладок обнаруженный на данной территории можно классифицировать, как низкий и средний.

Рекомендации:

Разработать план интегрированной защиты растений с учетом особенностей территории. Провести инсектицидные обработки территории для дополнительного контроля потенциального увеличения численности непарного шелкопряда на данной территории.

Подписи:

Глава
Кыштовского сельсовета

Начальник отдела
лесных отношений по
Кыштовскому лесничеству

М.н.с. сектора
бакуловирусных исследований
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



Шипчин Н.В.

Пономарева Н.В.

Охлопкова О.В.

Администрация Кыштовского сельского совета
Кыштовского района Новосибирской области
632270, Новосибирская обл., Кыштовский р-н,
с. Кыштовка, ул. Ленина, д. 42
тел. (8-383-71) 21-605, e-mail: kgg@kyshtovka.nsknet.ru

АКТ

проведения обследования участка с многолетними насаждениями и близлежащих к участку березовых колок на территории с. Кыштовка

28 мая 2019 г.

Мы, нижеподписавшиеся, глава администрации Кыштовского сельсовета Кыштовского района Новосибирской области Шипчин Н.В., ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Колосов А.В. и младший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Охлопова О.В. составили настоящий акт в том, что 28 мая 2019 года нами было проведено обследование участка с многолетними насаждениями и близлежащих к участку березовых колок на территории с. Кыштовка. Общая территория участка составила 100 га. Целью обследования было обнаружение яйцекладок и гусениц непарного шелкопряда на указанных территориях и оценка возраста, которого достигли насекомые.

В результате обследования выявлено, что:

1. На деревьях фиксировалось от 2 до 7 потенциально жизнеспособных яйцекладок.
2. Отродившиеся гусеницы непарного шелкопряда находятся на ранних стадиях развития. Их количество оценивается, как низкое и среднее.

Вывод:

На территории участка с многолетними насаждениями вблизи с. Кыштовка Кыштовского района Новосибирской области началось отрождение гусениц непарного шелкопряда, пораженность яйцекладками деревьев в среднем фиксируется в диапазоне от 2 до 7 штук на одну березу. Численность яйцекладок и гусениц, обнаруженных на данной территории, следует классифицировать, как низкую и среднюю.

Рекомендации:

Провести инсектицидные обработки обследованного участка для контроля численности непарного шелкопряда на данной территории.

Подписи:

Глава
Кыштовского сельсовета



Шипчин Н.В.

В.н.с. сектора
бакуловирусных исследований
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



Колосов А.В.

М.н.с. сектора
бакуловирусных исследований
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



Охлопова О.В.

Крестьянское (фермерское) хозяйство
Стакановский Дмитрий Николаевич
ОГРНИП 315547600082987 ИНН 540126475210
630510, Россия, Новосибирская область, Новосибирский район,
д.п. Кудряшовский, ул. Боровая, 14
тел. +7(383)239-22-30

АКТ
о передаче опытного образца препарата «Вирин НШК»

28 мая 2019 г.

Мы, нижеподписавшиеся, глава крестьянского (фермерского) хозяйства Стакановский Д.Н., ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Колосов А.В. и младший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Охлопкова О.В. составили настоящий акт в том, что 28 мая 2019 года Колосов А.В. передал Стакановскому Д.Н. опытный образец препарата «Вирин НШК» для проведения обработок березовых колков общей площадью 50 га, расположенных вблизи участка с многолетними насаждениями, на территории с. Кыштовка Новосибирской области.

Подписи:


Глава крестьянского
(фермерского) хозяйства

В.н.с. сектора
бакуловирусных исследований
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора

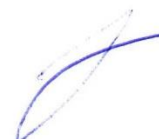
М.н.с. сектора
бакуловирусных исследований
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



Стакановский Д.Н.



Колосов А.В.



Охлопкова О.В.

Администрация Кыштовского сельского совета
Кыштовского района Новосибирской области
632270, Новосибирская обл., Кыштовский р-н,
с. Кыштовка, ул. Ленина, д. 42
тел. (8-383-71) 21-605, e-mail: kgg@kyshtovka.nsknet.ru

АКТ

проведения обработки участков опытным препаратом «Вирин НШЛ» против
непарного шелкопряда на территории с. Кыштовка Новосибирской области

28 мая 2019 г.

Мы, нижеподписавшиеся, глава администрации Кыштовского сельсовета Кыштовского района Новосибирской области Шипчин Н.В., ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Колосов А.В. и младший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Охлопкова О.В. составили настоящий акт в том, что 28 мая 2019 года были проведены обработки препаратом «Вирин НШЛ» березовых колков, расположенных с восточной стороны участка с многолетними насаждениями, на территории с. Кыштовка Новосибирской области.

Для обработки была использована субстанция для приготовления экологически безопасного биопрепарата «Вирин НШЛ». Обработка проведена наземным способом с использованием опрыскивателя-распылителя PS257. Площадь обработанной территории составила 1 га. Численность непарного шелкопряда на обработанных участках является очаговой.

Подписи:

Глава
Кыштовского сельсовета



Шипчин Н.В.

В.н.с. сектора
бакуловирусных исследований
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



Колосов А.В.

М.н.с. сектора
бакуловирусных исследований
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора



Охлопкова О.В.

Администрация Кыштовского сельского совета
 Кыштовского района Новосибирской области
 632270, Новосибирская обл., Кыштовский р-н,
 с. Кыштовка, ул. Ленина, д. 42
 тел. (8-383-71) 21-605, e-mail: kgg@kyshtovka.nsknet.ru

АКТ

проведения обследования участка с многолетними насаждениями и близлежащих к участку березовых колок на территории с. Кыштовка

16 июля 2019 г.

Мы, нижеподписавшиеся, глава администрации Кыштовского сельсовета Кыштовского района Новосибирской области Шипчин Н.В., ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Колосов А.В. и младший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Охлопкова О.В. составили настоящий акт в том, что 16 июля 2019 года нами было проведено обследование участка с многолетними насаждениями и близлежащих к участку березовых колок на территории с. Кыштовка. Общая территория участка составила 100 га. Целью обследования было провести оценку комплекса проведенных природоохранных мероприятий.

В результате обследования выявлен стойкий положительный эффект по снижению численности непарного шелкопряда до экономически незначимого уровня (не более 10 насекомых на дерево, объедание составляло не более 5 %) на указанных территориях.

Рекомендации:

Для контроля численности непарного шелкопряда продолжить использование подходов, внедренных в полевой сезон 2019 г. на данной территории.

Подписи:

Глава
 Кыштовского сельсовета



Шипчин Н.В.

В.н.с. сектора
 бакуловирусных исследований
 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
 Роспотребнадзора



Колосов А.В.

М.н.с. сектора
 бакуловирусных исследований
 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
 Роспотребнадзора



Охлопкова О.В.