

Изобретение относится к сельскому хозяйству, в частности, отрасли защиты растений и может быть использовано при биологической защите сельскохозяйственных культур от вредных насекомых.

Известно использование микроспоридий для ограничения численности насекомых - фитофагов- [1]. Однако, из-за трудностей массового производства, в частности, основного действующего начала микроспоридий - их спор, они не приобрели достаточно широкого распространения в практике защиты растений.

Наиболее близким техническим решением по совокупности признаков заявляемому является способ получения спор микроспоридий рода *Valrimorpha*, как это изложено в прототипе [2].

Способ-прототип предусматривает выращивание капустной совки в лабораторной культуре, с последующим их заражением микроспоридиями, проведение ряда операций по оптимизации процесса: строгое выдерживание гидротермических условий содержания гусениц, фотопериода, заражение гусениц микроспоридиями, меры по регуляции диапаузы совки. Кроме того, скормливание гусеницами совки, с целью увеличения продукции спор, аналогом ювенильного гормона - алтазара. Технология осуществления способа трудоемка, хозяин микроспоридий - капустная совка - неспецифический для выращивания микроспоридий.

Из-за низкой, эффективности способа, заключающегося в небольшой массе гусениц совки, низкой их жизнеспособности и небольшом содержании спор микроспоридии, в прототипе предложено использование ювеноидов, с целью удлинения гусеничного развития, получения более крупных насекомых и увеличения выхода спор микроспоридий.

Известный способ имеет следующие недостатки:

низкая продуктивность, позволяющая получать споры микроспоридий в количествах, необходимых только для исследовательских целей, а не для нужд производства;

использование для целей получения спор микроспоридии неподходящего хозяина - капустную совку, с низкими биологическими и хозяйственными показателями, даже полная реализация которых не позволяет получить необходимое количество спор.

Способу присущ комплекс отрицательных показателей, как следствие разведения совки на искусственных питательных средах;

- высокая восприимчивость ко многим энтомопатогенным организмам, требующая для их устранения дополнительного комплекса профилактических мер;

- явление каннибализма, свойственное большинству фитофагов на гусеничной стадии, как следствие разведения их на ограниченном пространстве;

- дорогостоящие компоненты питательных сред и необходимость специального оборудования и помещений для разведения совки;

необходимость выращивания капустной совки, отличающихся большой вредоносностью, способной повреждать свыше 200 видов растений, что создает потенциальную угрозу урожаю;

использование в способе дорогостоящих препаратов - ювеноидов, гормонов насекомых, применение которых вызывает появление уродливых форм в популяциях совки.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа получения спор микроспоридий, путем выращивания спор микроспоридий на новом хозяине - гусеницах дубового шелкопряда с использованием стимулятора Бета-нафтоксиуксусной кислоты позволило бы обеспечить массовое получение спор микроспоридий - действующее начало, в необходимых для производства количествах, с упрощением технологии разведения как хозяина, так и паразита, и за счет этого снизить трудозатраты.

Поставленная задача решается тем, что в способе получения спор микроспоридий, предусматривающем инфицирование спорами микроспоридий корма, содержащего биорегулятор развития хозяина-насекомого, скормливание инфицированного корма насекомым и их выращивание, согласно изобретению, в качестве хозяина насекомого используют дубовый шелкопряд, а в качестве биорегулятора - бета нафтоксиуксусную кислоту в концентрации 0,005-0,009% от количества корма, причем дубовый шелкопряд используют в период с начала третьего до середины пятого возраста, а споры Микроспоридий вводят в корм из расчета  $10^5$ - $10^9$  спор на насекомое.

Соединение из класса фитогормонов, используется в производстве для увеличения числа завязей [3]. В предлагаемом способе БНУ вводят в организм гусениц шелкопряда вместе с кормом, предварительно обрабатывая водными суспензиями листья кормового растения.

Использование гусениц дубового шелкопряда для выращивания спор микроспоридий обеспечивает массовое получение энтомопатогена за счет значительно большей массы гусениц шелкопряда и, вследствие благоприятного действия стимулятора, активации метаболизма гусениц, увеличению накопления жира, белка, а также увеличения количества и функциональной активности гемоцитов. Все это в совокупности способствовало увеличению урожая спор микроспоридий.

Заявляемый способ получения спор микроспоридий реализован следующим образом.

В экспериментах использовалась энтомопатогенная микроспоридия *Valrimorpha antheraea*, которая выращивалась на гусеницах дубового шелкопряда. Для определения оптимального и граничных периодов в развитии гусениц при которых заражение микроспоридией способно достигнуть наибольшую продуктивность, гусениц инфицировали маточной суспензией микроспоридии в начале 2-го, или 3-го, или 4-го, или 5-го возрастов, а также в середине 5-го возраста (на 7-й день). Вместе с суспензией микроспоридии, гусеницам вскармливали также стимулятор БИУ.

Продуктивность микроспоридии, выращенной по заявляемому способу сравнивали с продуктивностью микроспоридии, полученной по способу-прототипу. Для этого микроспоридию выращивали на гусеницах капустной совки с использованием ювенильного гормона алтазара,

Пример 1. Для обоснования способа использовали более 350 гусениц дубового шелкопряда, которых выращивали по общепринятой технологии на листьях березы (4). До момента линьки на 2-й возраст, их выращивали в одной группе.

Далее, перенявших на 2-й возраст гусениц делили на две группы. Для обработки листьев готовили суспензию спор микроспоридии, титр которой подсчитывали в камере Горяева. Использовали дозу  $10^7$  спор в расчете на одну гусеницу. Первой группе гусениц предлагали корм, обработанный суспензией спор, в которую одновременно прибавляли стимулятор, в концентрации 0,007%. Обработку суспензией спор корма проводили

однократно в обоих вариантах. Второй группе гусениц предлагали корм, обработанный стимулятором один раз в день на протяжении всего периода роста гусениц.

В табл. 1 приведены результаты, характеризующие динамику накопления массы гусениц на протяжении 3-х последних возрастов шелкопряда, а также иллюстрируют ряд физиологических показателей развития гусениц, коррелирующих с накоплением спор. Если к началу эксперимента, в 3-м возрасте, масса гусениц была практически одинаковой, то к тому моменту, когда гусеницы закончили развитие группа гусениц, которая получила стимулятор, увеличила массу на 39,6%. Существенным было и увеличение содержания жира на 92,9%, белка на 15,7% и гемоцитов в гемолимфе гусениц на 37,0%. Интенсификация метаболизма гусениц, увеличивала жизнеспособность гусениц, что способствовало интенсивному накоплению в них спор микроспоридии.

Для этого инфицирование спорами гусениц проводили в начале 2-го, или 3-го, или 4-го, или 5-го, а также середины 5-го возрастов. Гусеницам с кормом предлагали водные суспензии спор в следующих разведениях:  $10^3$ ;  $10^5$ ;  $10^7$  и  $10^{11}$  спор на одну гусеницу. Необходимые дозы спор получали путем разведения исходных суспензий. Для заражения гусениц использовали споры со сроком хранения не более шести месяцев, при температуре +4 - 6°.

Пример 2. Использовались 550 гусениц дубового шелкопряда, перелинявших на второй возраст. В заранее приготовленные для заражения исходные суспензии спор микроспоридии вводили стимулятор заданной концентрации и этой смесью обрабатывали корм для гусениц. Капустную совку выращивали по способу-прототипу, в оптимальных условиях, используя ювеноидальтозар.

В табл. 2 приведены результаты, характеризующие продуктивность микроспоридии, выращенной на гусеницах дубового шелкопряда. Как видно из представленных данных, исходная масса гусениц 2-го возраста дубового шелкопряда в 2,5 раза превышает массу гусениц совки. Урожай спор, полученных по заявляемому способу, превышал способ-прототип в 7-20 раз. Дисперсионный анализ выявил статистически достоверное (с вероятностью 0,99) увеличение показателя урожая спор, полученных из гусениц шелкопряда. Однако, учитывая сравнительно небольшую массу гусениц 2-го возраста и общий урожай полученных спор в сравнении с урожаем, полученным при инфицировании в следующих возрастах, очевидно, что нецелесообразно выращивать споры на гусеницах 2-го возраста.

Пример 3. Гусеницам шелкопряда перелинявших на 3-й возраст в количестве 450 штук с кормом вводили расчетное количество спор микроспоридии и стимулятор БНУ. Параллельно, в Оптимальных условиях выращивали капустную совку, Согласно прототипу. Предварительно были изменены наиболее важные биологические показатели обоих насекомых, влияющих на урожай микроспоридии перед заражением.

В табл. 3 представлены данные, характеризующие эти показатели. Как видно, по всем сравниваемым показателям гусеницы шелкопряда значительно превосходили, с высоким уровнем достоверности, капустную совку. При этом, по такому показателю, как масса гусениц, это превышение достигало в 8 и более раз, что в совокупности с другими показателями, способствовало большему урожаю спор. Значительное количество деформированных особей капустной совки -13,8% - результат использования ювеноида - альтозара.

Исходным, охарактеризованным выше, популяциям гусениц обоих видов, с первым кормлением предлагали споры микроспоридии в различных концентрациях совместно со стимулятором. В табл. 4 представлены результаты, характеризующие урожайность спор микроспоридии. Установлено, с высоким уровнем достоверности ( $P=0,99$ ), что урожайность спор полученных по предлагаемому способу в 86-212 раз выше способа прототипа. При этом, оптимальная концентрация первоначально инфицированных спор гусеницам шелкопряда составила  $10^5$ ;  $10^7$  и  $10^9$  спор/гусениц. Граничные концентрации  $10^3$   $10^{11}$  спор/гусеницу. Оптимальные концентрации стимулятора БНУ составляют 0,005; 0,007 и 0,009%.

Пример 6. Перелинявших на 4-й возраст гусениц шелкопряда отбивали в количестве 420 штук, формировали варианты, определяя при этом характеристику основных показателей перед первым кормлением.

В табл. 5 представлены сравнительные показатели развития гусениц шелкопряда и совки. Заражение спорами гусениц обоих видов насекомых микроспоридиями совместно со стимулятором, позволило получить максимальный урожай спор, при выращивании их на дубовом шелкопряде, что иллюстрируют данные табл. 6. При этом полученный урожай спор с одной гусеницы шелкопряда в 36-113 раз больший, чем в способе-прототипе с вероятностью 0,99.

Пример 5. Отбивали 420 перелинявших на 5-й возраст гусениц шелкопряда, определяли их основные показатели жизнеспособности, которые приведены в табл. 7. С высоким уровнем достоверности (0,95-0,99) гусеницы шелкопряда превосходили показатели гусениц капустной совки, хозяев микроспоридий.

Гусениц начала 5-го возраста инфицировали микроспоридией совместно со стимулятором. Как следует из данных табл. 8 в пределах оптимальных исходных концентрациях  $10^5$ ;  $10^7$  и  $10^9$  спор/гусеницу, получен максимальный урожай с пор микроспоридии, при выращивании их на гусеницах шелкопряда, значительно превышал способ-прототип,

Пример 6. Гусениц шелкопряда середины 5-го возраста (7-й день) инфицировали микроспоридией совместно со стимулятором. В табл. 9 представлены показатели продуктивности спор микроспоридии. В сравнении со способом-прототипом, продуктивность Предлагаемого способа выше, однако использовать гусеницы шелкопряда в середине 5-го возраста для выращивания в них микроспоридий нецелесообразно. Наиболее оптимальные периоды в развитии гусениц шелкопряда пригодные для получения микроспоридий с максимальной продуктивностью являются начало 3-го, или 4-го. или 5-го возрастов.

Использование заявляемого способа получения спор микроспоридий обеспечивает по сравнению с существующим способом следующие преимущества:

использование в качестве хозяина на котором выращиваются споры микроспоридий гусениц дубового шелкопряда, технология разведения которого разработана с использованием малоценных древесных пород (граб, ива, береза);

высокая продуктивность способа. Для использования спор микроспоридии в борьбе с молями на яблоне, гектарная норма расхода может быть получена из 20 гусениц шелкопряда, в то время как для получения такого же количества спор, выраженных по способу-прототипу потребуется 1400 шт. гусениц совки;

исключается использование дорогостоящих специфических стимуляторов гормональной природы.

Таким образом, только для садоводческих хозяйств Украины, с учетом того, что ежегодно проводится 2-3 обработки против комплекса открыто питающихся чешуекрылых вредителей, расчетный экономический эффект составит 50-75 тыс. рублей в год.

Таблица 1

Физиологическая характеристика популяций дубового шелкопряда зараженных микроспоридиями с использованием стимулятора

Возраст гусениц	Популяция шелкопряда зараженная микроспоридией без стимулятора				Популяция зараженная микроспоридией с использованием стимулятора БНУ			
	Масса, гусениц, мг	Содержание к сухому весу, %		Количество гемотоцитов, шт/мм <sup>3</sup>	Масса гусениц, мг	Содержание к сухому весу, %		Количество гемотоцитов
		жира	белка			жира	белка	
III	168 ± 4	10,2 ± 1,0	44 ± 4	2183	169 ± 3	10,9 ± 0,8	51 ± 3	2275
IV	507 ± 17	9,0 ± 0,8	46 ± 4	2256	627 ± 14	11,3 ± 0,9	51 ± 4	2684
V	1763 ± 47	6,1 ± 0,7	47 ± 3	2056	2612 ± 43	11,2 ± 1,1	52 ± 4	2619
Закончившие развитие	7938 ± 98	5,7 ± 0,6	46 ± 3	1989	11087 ± 106	11,0 ± 1,2	53 ± 4	2607

Таблица 2

Продуктивность микроспоридии при выращивании их на гусеницах дубового шелкопряда 2-го возраста в зависимости от величины первоначальной концентрации спор при заражении, а также концентрации стимулятора

Варианты опыта	Введено веществ в гусеницу		Хозяин – дубовый шелкопряд. Получение спор по предлагаемому способу	Хозяин – капустная совка. Получение спор по способу-прототипу
	Спор микроспоридии/гусеницу	Стимулятор БНУ, %		
Масса гусениц 2-го возраста в момент заражения микроспоридией, мг	-	-	105,7 ± 4,8	40,8 ± 3,2
Продуктивность микроспоридии при заражении спорами	х 10 <sup>3</sup>	0,003	104,7 · 10 <sup>9</sup>	8,4 · 10 <sup>9</sup>
Продуктивность микроспоридии	х 10 <sup>5</sup>	0,005	98,4 · 10 <sup>9</sup>	8,2 · 10 <sup>9</sup>
Продуктивность микроспоридии	х 10 <sup>7</sup>	0,007	90,3 · 10 <sup>9</sup>	7,4 · 10 <sup>9</sup>
Продуктивность микроспоридии	х 10 <sup>9</sup>	0,009	74,5 · 10 <sup>9</sup>	6,0 · 10 <sup>9</sup>
Продуктивность микроспоридии	х 10 <sup>11</sup>	0,011	58,8 · 10 <sup>9</sup>	2,1 · 10 <sup>9</sup>

Таблица 3

Характеристика гусениц дубового шелкопряда и капустной совки начала 3-го возраста хозяев спор микроспоридии

Сравниваемые показатели	Гусеницы дубового шелкопряда перелинявшие на 3-й возраст	Гусеницы капустной совки, перелинявшие на 3-й возраст	Достоверность разницы, Р
Длительность развития гусениц, сутки	$57,4 \pm 3,2$	$38,8 \pm 3,1$	0,99
Масса гусениц 3-го возраста в момент заражения микроспоридиями, кг	$164,6 \pm 3,8$	$53,2 \pm 2,8$	0,99
Масса гусениц закончивших развитие, мг	$975,8 \pm 69,5$	$99,3 \pm 4,0$	0,99
Количество деформированных особей, %	$1,2 \pm 0,1$	$13,8 \pm 1,3$	0,95
Выживаемость гусениц, %	$67,9 \pm 3,7$	$52,4 \pm 2,8$	0,95

Таблица 4

Продуктивность микроспоридии при выращивании их на гусеницах дубового шелкопряда 3-го возраста в зависимости от величины первоначальной концентрации спор при заражении, а также концентрации стимулятора

Варианты опыта	Введено веществ в гусеницу		Хозяин – дубовый шелкопряд. Получение спор по предлагаемому способу	Хозяин – капустная совка. Получение спор по способу-прототипу	Достоверность разницы, Р
	Спор микроспоридии/гусеницу	Стимулятор, БНУ, %			
Масса гусениц 3-го возраста в момент заражения микроспоридией, мг	-	-	$167,4 \pm 3,1$	$52,3 \pm 4,1$	0,99
Продуктивность микроспоридии при введении спор и стимулятора	$\times 10^3$	0,003	$468,3 \cdot 10^9$	$8,9 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^5$	0,005	$738,8 \cdot 10^9$	$8,6 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^7$	0,007	$750,6 \cdot 10^9$	$6,5 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^9$	0,009	$695,3 \cdot 10^9$	$3,2 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^{11}$	0,011	$401,9 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^9$	0,99

Т а б л и ц а 5

Характеристика гусениц дубового шелкопряда и капустной совки начала 4-го возраста хозяев спор микроспоридии

Сравниваемые показатели	Гусеницы дубового шелкопряда начала 4-го возраста	Гусеницы капустной совки начала 4-го возраста	Достоверность разницы, Р
Длительность развития гусениц, сутки	$55,8 \pm 2,6$	$37,7 \pm 2,2$	0,99
Масса гусениц 4-го возраста в момент заражения микроспоридиями; мг	$616,5 \pm 14,9$	$74,5 \pm 3,1$	0,99
Масса гусениц закончивших развитие, кг	$10103 \pm 106$	$126,5 \pm 5,8$	0,99

Продолжение табл.5

Сравниваемые показатели	Гусеницы дубового шелкопряда начала 4-го возраста	Гусеницы капустной совки начала 4-го возраста	Достоверность разницы, Р
Количество деформированных особей, %	$3,1 \pm 0,1$	$12,7 \pm 0,9$	0,99
Выживаемость гусениц, %	$72,4 \pm 9,8$	$67,3 \pm 4,1$	0,95

Таблица 6

Обоснование оптимальных и граничных параметров концентраций спор  
микроспоридии и стимулятора при выращивании спор по  
предлагаемому способу и прототипу

Варианты опыта	Введено веществ в гусеницу		Хозяин – дубовый шелкопряд. Получение спор по предлагаемому способу	Хозяин – капустная совка. Получение спор по способу - прототипу	Достоверность разницы, Р
	Спор микроспоридий/гусеницу	Стимулятор, БНУ, %			
Масса гусениц 4-го возраста в момент заражения микроспоридией, мг	-	-	$616,5 \pm 14,9$	$74,5 \pm 3,1$	0,99
Продуктивность микроспоридии при введении спор и стимулятора	$\times 10^3$	0,003	$407,8 \cdot 10^9$	$9,7 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^5$	0,005	$704,5 \cdot 10^9$	$12,4 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^7$	0,007	$832,4 \cdot 10^9$	$11,9 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^9$	0,009	$874,5 \cdot 10^9$	$7,7 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^{11}$	0,011	$505,7 \cdot 10^9$	$6,1 \cdot 10^9$	0,99

Таблица 7

Характеристика гусениц дубового шелкопряда и капустной совки хозяев спор микроспоридии при заражении гусениц в начале 5-го возраста

Сравниваемые показатели	Гусеницы дубового шелкопряда начала 5-го возраста	Гусеницы капустной совки начала 5-го возраста	Достоверность разницы Р
Длительность развития гусениц, сутки	$52,9 \pm 3,4$	$35,2 \pm 2,6$	0,95
Масса гусениц 5-го возр. в момент заражения микроспоридий, мг	$901,3 \pm 17,2$	$85,5 \pm 4,1$	0,99
Масса гусениц закончивших развитие, мг	$10908 \pm 115$	$127,4 \pm 5,4$	0,99
Количество деформированных особей, %	$2,1 \pm 0,1$	$14,2 \pm 1,1$	0,95
Выживаемость гусениц, %	$82,6 \pm 3,7$	$76,2 \pm 5,0$	0,90

Т а б л и ц а 8

Обоснование оптимальных и граничных параметров концентраций спор микроспоридии и стимулятора при выращивании спор по предлагаемому способу и прототипу

Варианты опыта	Введено веществ в гусеницу		Хозяин – дубовый шелкопряд. Получение спор по предлагаемому способу	Хозяин – капустная совка. Получение спор по способу - прототипу	Достоверность разницы Р
	Спор микроспоридий/гусеницу	Стимулятор, БНУ, %			
Масса гусениц начала 5-го возраста в момент заражения микроспоридией, мг	-	-	$901,3 \pm 17,2$	$85,5 \pm 4,1$	0,99
Продуктивность микроспоридии при введении спор и стимулятора	$\times 10^3$	0,003	$384,4 \cdot 10^9$	$8,9 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^5$	0,005	$627,5 \cdot 10^9$	$11,8 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^7$	0,007	$746,4 \cdot 10^9$	$10,9 \cdot 10^9$	0,99

Продолжение табл.8

Варианты опыта	Введено веществ в гусеницу		Хозяин – дубовый шелкопряд. Получение спор по предлагаемому способу	Хозяин – капустная совка. Получение спор по способу - прототипу	Достоверность разницы Р
	Спор микроспоридий/гусеницу	Стимулятор, БНУ, %			
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^9$	0,009	$759,2 \cdot 10^9$	$8,2 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^{11}$	0,011	$409,6 \cdot 10^9$	$7,1 \cdot 10^9$	0,99

Т а б л и ц а 9

Продуктивность микроспоридии при выращивании их на гусеницах шелкопряда  
средины 5-го возраста при выращивании спор по предлагаемому способу  
и способу-прототипу

Варианты опыта	Введено веществ в гусеницу		Хозяин – дубовый шелкопряд. Получение спор по предлагаемому способу	Хозяин – капустная совка. Получение спор по способу - прототипу	Достоверность разницы Р
	Спор микроспоридий/гусеницу	Стимулятор, БНУ, %			
Масса гусениц в середине 5-го возраста, мг	-	-	$1010 \pm 64$	$97 \pm 5$	0,99
Продуктивность микроспоридии при введении спор и стимулятора	$\times 10^3$	0,003	$201,6 \cdot 10^9$	$7,4 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^5$	0,005	$186,4 \cdot 10^9$	$8,2 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^7$	0,007	$154,7 \cdot 10^9$	$9,6 \cdot 10^9$	0,99

Продолжение табл. 9

Варианты опыта	Введено веществ в гусеницу		Хозяин – дубовый шелкопряд. Получение спор по предлагаемому способу	Хозяин – капустная совка. Получение спор по способу - прототипу	Достоверность разницы Р
	Спор микроспоридий/гусеницу	Стимулятор, БНУ, %			
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^9$	0,009	$162,3 \cdot 10^9$	$8,0 \cdot 10^9$	0,99
Продуктивность микроспоридии	$\times 10^{11}$	0,011	$103,2 \cdot 10^9$	$6,6 \cdot 10^9$	0,99