

УДК 595.752.3:577.15.3

И. М. Нагорная

## ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СМЕРТНОСТИ ЯИЦ ЧЕРВЕЦА КОМСТОКА ПОСЛЕ ФУМИГАЦИИ

При совершенствовании средств и приемов борьбы с вредителями растений и сельскохозяйственных продуктов насущной задачей является создание таких режимов обработок, которые позволяют снизить остаточные количества применяемых препаратов. Эта цель достигнута в разработанном Всесоюзным институтом карантина и защита растений приеме фумигации смесью метилбромидом и  $\text{CO}_2$  плодов и саженцев, пораженных червецом Комстока, опасным карантинным вредителем (Мордкович, 1971). При этом результаты обработки контролируются подсчетом личинок, отродившихся из фумигированных яйцекладок, сохранивших жизнеспособность (Михайлов, 1953). Однако такой подсчет становится возможным только спустя 10—15 дней (длительность развития личинок), что является одним из существенных недостатков метода.

В связи с этим перед отделом экологии насекомых Института зоологии АН УССР была поставлена задача — разработать ускоренный метод определения смертности яиц червца Комстока после фумигации, применимый в условиях работы фумигационных отрядов.

Червец Комстока (*Pseudococcus comstocki* Kuw.) является карантинным вредителем и на территории Советского Союза распространен в Узбекистане, Таджикистане, Казахстане, Киргизии, Туркмении, Азербайджане, Армении, Грузии, Краснодарском крае, а также в Приморском крае. В зависимости от климатических условий мест обитания имеет от 3 до 7 поколений. В Средней Азии имеет 3—4 поколения. Червец является многоядным вредителем, поражающим более 300 видов растений, однако наибольший вред приносит шелковице, гранатам и айве.

Самка червца бескрылая, с овальным, слабо сплюснутым, разделенным на сегменты телом длиной 2,2—5,5 мм, серовато-розового цвета, покрытым белым мучнистым налетом. По бокам тела имеются 17 пар тонких восковидных отростков. Хоботок 2-члениковый, ширококонический, ноги хорошо развиты. Самец имеет 1 пару прозрачных крыльев с упрощенным жилкованием, длина тела около 1 мм, рот отсутствует.

Самка откладывает от 220 до 600 яиц, причем самки I поколения наиболее плодовиты. Яйцо овальной формы, блестящее, светло-желтое или бледно-оранжевое, размеры  $0,3 \times 0,6$  мм. Яйца находятся в продолговатом мешке — овисаке, длиной 1,5—5 мм, образованном рыхлыми восковыми белыми нитями. Овисаки у зимующих яиц плотнее, чем у летних. Зимовка в стадии яйца, причем низкие температуры ( $-30^\circ\text{C}$ ) не повреждают яиц. Зимующие яйца появляются в конце сентября — начале октября, размещаются в трещинах коры, развилках ветвей, в почве у ствола дерева, под опавшей листвой, а также в трещинах и щелях строений. Яйца устойчивы к гипоксии, например, летние яйца остаются живыми после 2 суток пребывания в воде арыков, являющихся одним из путей распространения вредителя. Весеннее развитие яйца длится 10—15 дней, причем отрождение личинок I поколения совпадает с распусканием почек шелковицы и растянуто с конца марта по май. Это обусловлено глубиной и условиями размещения яйцекладок (Насекомые и клещи, 1972).

Распространение вредителя возможно при перевозке фруктов, особенно плодов граната, имеющих глубокую чашечку, в которой самки размещают яйцекладки, а также саженцев из плодопитомников. Для обеззараживания плодов и посадочного материала применяют, как отмечалось, универсальный фумигант — парообразный метилбромид в смеси с  $\text{CO}_2$ . Метилбромид относится к ядам, парализующим нервную систему.

В исследованиях механизма действия метилбромида на организм насекомых было обнаружено ингибирование сульфгидрильных групп (Winteringham, 1955; цит. по Бахишев, 1969). Исходя из механизма действия метилбромида, следует ожидать изменения структуры и свойств белков и ферментов клетки.

Основным различием между живым и мертвым организмом является наличие у первого координированных процессов обмена веществ, протекающих при участии ферментов и обеспечивающих энергетические потребности организма. По данным многих исследователей энергетические потребности при развитии эмбриона в яйце обеспечиваются за счет расхода запасов жира и гликогена (Шельдешова, 1946; Rothstein, 1952; Chino, 1963; Kageyama, 1976). Количество жира при развитии эмбриона японского жука, например, снижается на 58%, количество гликогена уменьшается вдвое. Последовательность расходования этих энергетических материалов определяется особенностями развития яйца: развивается ли оно с диапаузой или без нее. В исследованиях, проведенных на разных видах насекомых, отмечено, что жир служит главным источником энергии в постдиапаузный период развития яиц. В ранний период развития яиц и во время диапаузы поступление энергии обеспечивается за счет деструкции гликогена (Rothstein, 1952; Kageyama, 1976). Известно также, что снижение содержания гликогена в грене тутового шелкопряда начинается с первого дня, причем гидролиз осуществляется амилазой яиц, число изоферментов которой уменьшается в процессе развития яиц от 7 до 5, по мере истощения запаса гликогена (Филиппович, Минина, 1974).

### Методика определения смертности диапаузирующих яиц

Основываясь на данных исследований упомянутых авторов, мы предположили, что активность амилазы, присутствующей в живых яйцах и ингибированной при фумигации, может служить критерием для определения погибших яиц. За основу был принят метод Смита и Роя (Асатиани, 1957). Суть предлагаемого нами метода заключается в следующем: при инкубации содержимого живых яиц с крахмалом амилаза гидролизует его до декстрина, который не образует с йодом окрашенного соединения. Поэтому добавление йода по истечении времени инкубации вызывает образование желтой окраски. Отсутствие амилазной активности в мертвых яйцах приведет к тому, что после инкубирования их с крахмалом, последний не будет гидролизован. Вследствие этого добавление раствора йода к инкубационной смеси вызовет образование синевато-фиолетовой окраски, характерной для йод-крахмального комплекса. Для проведения определения необходимы следующие реактивы: 1) 0,1—0,2%-ный растворимый крахмал на 0,9%-ном растворе хлорида натрия, хлор-ион которого является естественным активатором амилаз (Диксон, Уэбб, 1966). Для приготовления его наливают в колбу или стакан половину объема раствора хлорида натрия и вносят навеску растворимого крахмала. При постоянном помешивании крахмал доводят до кипения, остужают и доводят до нужного объема. 2) 0,3%-ный йодный реактив (0,3%-ный раствор металлического йода в 3%-ном растворе йодистого калия). Перед употреблением разбавляют тремя объемами дистиллированной воды.

Определение ведут следующим образом: на часовое стекло помещают 0,03 мл (каплю) растворимого крахмала, яйцо погружают в каплю и разрушают его оболочку так, чтобы содержимое яйца смешалось с субстратом. Каплю помешивают круговыми движениями стекла, затем смесь накрывают вторым стеклом и инкубируют при температуре 20—30°С в течение 5—15 мин. По окончании инкубации к смеси добавляют 0,01 мл йодного реактива и перемешивают смесь круговыми движениями стекла, ожидая развития окраски. В предварительном определении устанавливают длительность инкубации живых яиц для полного гидролиза крахмала, содержащегося в инкубационной смеси. Предложенная выше методика явилась завершением поиска наиболее простого варианта определения.

Предлагаемый метод испытывали на яйцах червеца Комстока, а также на яйцах тутового и непарного шелкопряда (табл. 1 и 2). Из представленных данных видно,

**Т а б л и ц а 1. Результаты определения смертности одиночных яиц непарного шелкопряда при воздействии на них высокой температуры или наркотика**

Воздействие		Окраска	
Способ	Время, часы	Опыт	Контроль
Прогрев, 80° С	3	Фиолетово-синяя	Желтая
Пары хлороформа	3	Желтая *	Желтая
	30	Фиолетово-синяя	Желтая

\* Желтая окраска инкубационной смеси свидетельствует о том, что яйцо не погибло.

**Т а б л и ц а 2. Определение смертности яиц червеца Комстока, заключенных в овисаке**

Режим фумигации	Окраска яиц			
	в почве	под корой	в плодах	контроль
Метилбромид (60 г/м <sup>3</sup> ) + CO <sub>2</sub> (80 г/м <sup>3</sup> ), 3 ч. 20 мин., 11° С, ПСКВ * — 200	Желтая	Фиолетово-синяя	Фиолетово-синяя	Желтая
Метилбромид (80 г/м <sup>3</sup> ), 3 ч. 30 мин., 11° С, ПСКВ — 300	Желтая	Фиолетово-синяя	Фиолетово-синяя	Желтая
Метилбромид (100 г/м <sup>3</sup> ), 45 ч. 30 мин., 6—18° С, ПСКВ — 3867	Фиолетово-синяя	Фиолетово-синяя	Фиолетово-синяя	Желтая

\* ПСКВ — произведение средней концентрации на время экспозиции в часограммах.

что для гибели яиц червеца, размещенных в почве, была необходима более высокая доза фумиганта, чем для яиц менее защищенных.

Для отработки дозировок и режимов фумигации токсикологам необходимо учитывать процент погибших яиц. Для выполнения этого требования при работе с такими мелкими яйцами, как у червеца Комстока (0,3×0,6 мм), была предложена следующая модификация метода. Готовят 0,1%-ный растворимый крахмал на 0,9%-ном растворе хлорида натрия. Узкую полоску фильтровальной бумаги смачивают раствором крахмала и слегка подсушивают. Под бинокулярным микроскопом на бумаге размещают двумя рядами фумигированные и живые яйца червеца с интервалами между ними 0,5 см. Затем препаровальной иглой разрывают их оболочку таким образом, чтобы содержимое яиц диффундировало в бумагу. Полоску бумаги инкубируют 10—15 мин, во влажной камере при 20—25° С, затем протаскивают быстрым движением через небольшой объем йодного реактива. В месте диффузии содержимого живого яйца в бумагу образуется обесцвеченная зона гидролизованного крахмала на фоне синей окраски бумаги.

Предложенный выше метод определения смертности диапаузирующих яиц, основанный на активности амилазы, дает четкие результаты в осенне-зимний период. В недиапаузирующих яйцах активность амилазы невысока (Ижевский, 1974) и для оценки овицидного действия препаратов мы предлагаем метод, основанный на активности фермента лизоцима. Этот метод более пригоден для лабораторных условий ввиду специфических требований к приготовлению агара, содержащего субстрат.

### Методика определения смертности недиапаузирующих яиц

Известно, что одним из факторов гуморального иммунитета насекомых является фермент лизоцим, выделенный из гемолимфы и тканей средней кишки (Мориг, Месснер, 1969). Лизоцим обнаружен также в яйце долгоносика (Ourth, 1980). Нами обнаружено

наличие лизоцимподобного фермента, способного гидролизовать тест-бактерию *Micrococcus lysodeikticus* в яйцах червеца Комстока, тутового шелкопряда, непарного шелкопряда и колорадского жука. В связи с этим мы использовали лизоцимподобную активность яиц для определения смертности их. Определение активности лизоцима проводили методом диффузии в агар, основанным на способности лизоцима, диффундирующего из биологической пробы, помещенной в выемку на агаре, лизировать клетки тест-бактерии, заключенные в агаровом слое. Вокруг выемки образуется кольцо прозрачного агара вследствие лизиса клеток (Лабинская, 1978).

Для проведения определения готовят 1—1,5%-ный агар на цитратно-фосфатном буфере pH 6,2. В агар при 50° С добавляют взвесь ацетонового порошка клеток микрококка в 0,9%-ном растворе хлорида натрия и тщательно перемешивают. Затем смесь агара с клетками микрококка разливают в чашки Петри, расположенные строго горизонтально, где агар застывает. Затем в агаре металлическим цилиндром делают выемки диаметром 0,2—0,4 см, в которые вносят раствор хлорида натрия и помещают анализируемое яйцо. Препаровальной иглой разрушают оболочку яйца так, чтобы содержимое яйца могло диффундировать в слой агара. Чашку закрывают и помещают на инкубацию при 25—30° С на 12—20 часов. По окончании инкубации вокруг живого яйца образуется кольцо прозрачного агара, которое выделяется в проходящем свете на фоне мутно-желтого агара, содержащего клетки микрококка. Кольцо прозрачного агара, образовавшееся вокруг яйца червеца Комстока, может достигать ширины 0,5—1 мм, тогда как вокруг яйца непарного шелкопряда образуется кольцо в 2—3 мм ширины. Погибшие яйца не обладают активностью этого фермента (табл. 3).

Таблица 3. Оценка состояния яиц через 30 мин. после теплового воздействия

Объект *	2-часовой прогрев при 70° С	Контроль
Грена тутового шелкопряда	Нет лизиса	Лизис
Яйца червеца Комстока	Нет лизиса	Лизис

Таблица 4. Оценка состояния яиц через 3 часа после фумигации

Объект	Фумигированные яйца	Контроль
Одиночные яйца, 10 шт.	Лизис, 4 шт.	Лизис, 7 шт.
Гомогенат	Нет лизиса, 6 шт.	Нет лизиса, 3 шт.
	Нет лизиса	Лизис

\* Анализировали гомогенат яиц.

В табл. 4 представлены результаты определения смертности яиц червеца Комстока, фумигированных метилбромидом. Яйца, расположенные под корой или в массе сухих листьев, фумигировали при таком режиме: метилбромид 50 г/м<sup>3</sup>, экспозиция 18 часов, 10—15° С, ПСКВ 900 часогр/мм.

Лабораторные испытания предлагаемых методов, проведенные совместно с сотрудниками лаборатории Узгоскарантина, показали пригодность теста на амилитическую активность для определения смертности диапаузирующих яиц червеца Комстока, тогда как для обнаружения смертности не диапаузирующих яиц более пригоден тест, основанный на активности лизоцима.

Использование разработанного метода в практике службы карантина растений позволит с большой точностью устанавливать режимы фумигации, снизить содержание остаточных количеств препарата в плодах, улучшить их сохранность и товарные качества.

#### SUMMARY

A proximate method is developed to determine the death of *Pseudococcus comstocki* Kuw. diapausing eggs after fumigation with methyl bromide. The method is based on the presence of amylolytic activity in living eggs and its absence in dead ones. The eggs are differentiated into living and dead ones according to changes in the incubation medium colouration. During incubation amylase of living eggs hydrolyzes the medium

starch, after which addition of the iodine reagent causes yellow colouration. During incubation of dead eggs starch is not hydrolyzed therefore addition of the iodine reagent causes violet-blue colouration of the medium. The suggested method highly reduces the time taken for determining the eggs death as compared with the commonly used method. In case of nondiapausing eggs the death may be determined by the method based on the activity of living egg lysozyme.

- Асатиани В. С. Биохимическая фотометрия.— М.: Изд-во АН СССР, 1957.— 836 с.
- Бахишев Г. Н. Содержание сульфгидрильных групп в крови, сыворотке крови и печени крыс, отравленных бромистым метилом.— Гигиена применения токсикологами пестицидов и клиника отравления, 1969, вып. 7, с. 75—77.
- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.— М.: Мир, 1966.— 816 с.
- Ижевский С. С. Функциональные особенности ферментных систем кишечника насекомых-фитофагов.— В кн.: Вопросы экологической физиологии беспозвоночных.— М., 1974, с. 156—158.
- Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований.— М.: Медицина, 1978.— 392 с.
- Михайлов Е. Н. Грена.— Ташкент: Госиздат, 1953.— 155 с.
- Мордкович Я. Б. Инструкция по обеззараживанию бромистым метилом посадочного материала плодовых, субтропических культур, орехоплодных культур, винограда, лесодекоративных пород, луковичных цветковых растений от карантинных и других опасных вредителей.— М., 1971, с. 31.
- Мориг В., Месснер Б. Значение лизоцима в антибактериальном иммунитете насекомых.— Журн. общей биол., 1969, 3, № 1, с. 62—71.
- Насекомые и клещи — вредители сельскохозяйственных культур / Под ред. Крыжановского О. Л., Данциг Е. М.— Л.: Наука, т. 1, 1972,— 323 с.
- Филиппович Ю. Б., Минина Н. И. Амилаза в тканях тутового шелкопряда *Bombyx mori*.— В кн.: Вопросы экологической физиологии беспозвоночных.— М.: Наука, 1974, с. 213—218.
- Шельдешова Г. Г. К физиологии эмбрионального развития китайского дубового шелкопряда.— Изв. АН СССР, сер. биол., 1946, 4, с. 381—390.
- Chino H. Respiratory enzyme system of the Bombyx silkworm egg in relation to the mechanism of the formation of sugar alcohols.— Arch. Biochem. Biophys. 1963, 102, p. 400.
- Kageyama T. Pathways of carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm *Bombyx mori*.— Insect. Biochem., 1976, 6, p. 507—551.
- Ourth D. D., Jones B. R. Lysozyme in eggs of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae).— Experientia, 1980, 36, 2, p. 196.
- Rothstein F. Biochemical changes during the embryonic development of the Japanese Beetle.— Physiol. Zoölogy, 1952, 25, 2, p. 171—177.

Институт зоологии  
АН УССР

Поступила в редакцию  
9.II 1981 г.

УДК 001.8.592+631.4

Л. В. Руденская

## К МЕТОДИКЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЧВЕННЫХ ЛОВУШЕК В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В синэкологических исследованиях напочвенных беспозвоночных широко применяются почвенные ловушки Барбера. Эти ловушки представляют собой стеклянные банки емкостью 0,5 л с диаметром входного отверстия 72—75 мм, помещаемые вровень с краями субстрата (подстилки, почвы, снега) чаще непосредственно на поверхности исследуемой площадки, либо в траншеях или под укрытиями. Обычно используют ловушки, заполненные примерно на 1/3 слабым раствором формалина, водой или небольшим (3—4 см) слоем земли, а также свободные или с разнообразными приманками (см. книжные обзоры — Skuhravy, 1956; Balogh, 1958; Тихомирова, 1975).