

УДК 595.7.082.26

ОТБОР ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НАСЕКОМЫХ

А. З. Злотин, Ю. Д. Бойчук

Харьковский педагогический университет, ул. Артема, 29, 310168 Харьков, Украина

Получено 23 декабря 1996

Добір вихідного матеріалу для лабораторного культивування комах. Злотин О. З., Бойчук Ю. Д.— В статті містяться теоретичні і експериментальні дослідження принципів і методів добору вихідного матеріалу з природи і інсектаріїв для створення культур комах. Вперше на основі теоретичного узагальнення і результатів експериментів сформульовані біологічні основи добору вихідного матеріалу для культивування комах.

Ключові слова: життєздатність, вихідний матеріал, добір, культура комах, стартова колонія, якість комах.

Initial Material Selection for Laboratory Insect Cultivation. Zlotin A. Z., Boichuk Yu. D. — The article deals with theoretical and experimental investigations of the principles and methods of initial material selection, in the nature and insectarium, for creating insect cultures. The biological ground of initial material selection for insects cultivation is formulated for the first time on the basis of theoretical generalization of data and experimental outcomes.

Key words: viability, initial material, selection, insect culture, starting colony, insect quality.

Проблема разработки принципов и методов отбора исходного материала является чрезвычайно актуальной в связи с расширением возможностей использования культур насекомых (Злотин, 1989; Тамарина, 1990; Бойчук, 1996). На практике за основу будущей культуры до сих пор берут случайно выбранную популяцию насекомых, и это, в конечном результате, негативно отражается на эффективности реализации программы разведения.

Целью наших исследований являлось биологическое обоснование отбора исходного материала для культивирования насекомых, разработка принципов и методов его практического осуществления.

Работа проводилась в 1992–1996 гг. на экспериментальной базе УкрНИИ шелководства и биолaborатории Харьковского лесозащитного предприятия.

В качестве объектов исследования использовали дикие популяции непарного шелкопряда (*Ocneria dispar* L.), американской белой бабочки (*Huphantria cunea* Drury), которых выкармливали на искусственной питательной среде Дубко; 8 районированных пород тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.) выкармливали листом шелковицы. Фотогигротерморезим выкормок — оптимальный для каждого вида.

В ходе работы нами было установлено, что для отбора исходного материала из природных популяций или инсектарных культур целесообразно провести оценку с помощью случайной выборки для определения его физиологического состояния и пригодности для реализации намеченной программы разведения. В том случае, если такое соответствие имеется, отбор осуществляют по целевому принципу.

Одним из признаков качества исходного материала является фаза градиционного цикла развития популяции, с которой он был отобран. Для проведения эксперимента использовали 3 популяции непарного шелкопряда — Бахчисарайскую, Севастопольскую и Ялтинскую. После инкубации и выкормки гусениц на основе полученных данных производили расчеты и их значения вводили в формулу общей жизнеспособности и перспективного роста числен-

Т а б л и ц а 1. Общая жизнеспособность и перспективный рост численности популяций непарного шелкопряда разных фаз градации (среднее за 1993 — 1994 гг.)

Table 1. General viability and perspective growth of gypsy moth population size in various phases of gradation (average in 1993 — 1994)

Показатели	Бахчисарайская	Севастопольская	Ялтинская
Жизнеспособность яиц (V1), %	87,5±0,3	95,8±1,9	59,0±1,7
Жизнеспособность личинок (V2), %	68,0±0,2	80,5±0,7	42,6±2,3
Жизнеспособность куколок (V3), %	83,0±2,1	91,3±1,3	34,3±1,2
Общая жизнеспособность (V), %	49,4±1,3	70,4±1,8	8,6±0,6
Доля яйцекладущих самок (N), %	38,6±0,4	44,7±0,3	27,0±1,2
Средняя плодовитость самки (F), %	87,0±3,2	120,0±5,3	48,0±0,7
Перспективный рост численности популяции (R), раз	16,5±1,1	37,8±1,3	1,2±0,5

ности популяции (Злотин, Чепурная, 1994): $V = V_1 \cdot V_2 \cdot V_3$, где V — общая жизнеспособность, V_1 — жизнеспособность яиц, V_2 — жизнеспособность личинок, V_3 — жизнеспособность куколок. Для прогноза перспективного роста численности популяции использовали модификацию этой формулы: $R = V \cdot N \cdot F$, где R — перспективный рост численности популяции, V — общая жизнеспособность, N — доля яйцекладущих самок, F — средняя плодовитость самки. Полученные данные содержатся в таблице 1. Как видим, все 3 популяции имеют достоверные различия, что свидетельствует о нахождении их в различных градационных фазах. Севастопольская популяция находится в фазе роста численности и поэтому наиболее пригодна для формирования стартовой культуры.

Использование вышеуказанной формулы позволяет четко определить качество природных популяций насекомых и отобрать наиболее жизнеспособный материал.

На поверхности яиц насекомых всегда находятся микроорганизмы, которые нередко играют решающую роль в патогенезе болезней и гибели насекомых. Мы предположили, что степень загрязненности поверхности яиц бактериальной и грибковой микрофлорой является одним из показателей их качества.

Для определения зараженности бактериальной и грибковой микрофлорой яйца 3 популяций непарного шелкопряда высеивали на мясо-пептонный агар и сусло-агар. Чтобы определить наличие микроорганизмов внутри яиц, их обрабатывали дезинфектантом — раствором гипохлорита натрия, а потом в стерильных условиях растирали и делали посев на среды. Контроль — высеивание яиц, поверхность которых была обеззаражена гипохлоритом натрия.

В результате учета роста колоний микроорганизмов было установлено, что яйца Ялтинской популяции наиболее инфицированы (количество яиц, которые дали рост колоний бактерий — 77,5±0,5%, колоний грибов — 87,5±0,5%), яйца Севастопольской популяции оказались наименее инфицированными (соответственно 7,5±0,5% и 8,8±0,2%). Внутри яиц микроорганизмы не были обнаружены.

Т а б л и ц а 2. Оценка качества яиц непарного шелкопряда различных популяций (среднее за 1993—1994 гг.)

Table 2. Gauging of gypsy moth egg quality in different populations (average in 1993—1994)

Показатели	Бахчисарайская	Севастопольская	Ялтинская
Общее количество яиц в навеске, шт.	408±12	334±8	489±7
Полноценные яйца, %	78,5±2,7	91,9±1,8	42,4±2,4
Неоплодотворенные, %	10,8±0,8	1,4±0,7	28,4±1,2
Зараженные паразитами, %	5,8±0,4	2,0±0,2	16,2±0,4
С погибшим зародышем, %	2,2±0,4	3,2±0,2	5,8±0,2
Дефектные яйца, %	2,7±0,2	1,5±0,1	7,2±0,1
Средняя масса 1 яйца, мг	0,74±0,07	0,90±0,09	0,61±0,08

Результаты анализа дают возможность использовать яйца Севастопольской популяции в качестве исходного материала (не исключая проведения других методов оценки).

Для оценки качества яиц указанных популяций непарного шелкопряда применяли их анатомо-морфологический анализ. Из каждой популяции были отобраны средние пробы яиц по 300 мг. При помощи просматривания яиц под биноклем и скальпирования по методу Михайлова их разделили на фракции (табл. 2). Количество яиц в каждой фракции подсчитывали и выражали в процентном отношении к исходному количеству яиц в данной пробе. Сравнительная характеристика показывает, что качество яиц свидетельствует в пользу Севастопольской популяции. Таким образом, данный метод анализа яиц является простым и достаточно объективным методом определения их качества при создании культур насекомых.

Мы предположили, что между восстановительной активностью комплекса ферментных субстанций гемолимфы личинок насекомых, которую можно определить по скорости обесцвечивания ею перманганата калия, и жизнеспособностью личинок существует взаимосвязь. Для проверки этого мы взяли 8 пород тутового шелкопряда, путем надрезания ложноножек получали гемолимфу и проверяли по каждой породе скорость обесцвечивания ею 1%-ного раствора перманганата калия. Данные опыта приведены в таблице 3. Из таблицы видим, что между активностью гемолимфы и жизнеспособностью гусениц существует корреляция, коэффициент которой равен 0,810. Лучшими породами по этому показателю оказались М-7 и Укр-2.

Данный метод очень прост в исполнении и может широко применяться при оценке популяций на стадии личинки.

Для оценки популяции на стадии куколки мы использовали 2 популяции белой американской бабочки — Красноградскую и Херсонскую. В начале эксперимента определяли среднюю массу куколок-самок и куколок-самцов. Куколок инкубировали и проводили учет выхода имаго. Бабочек затем спаривали и определяли среднюю индивидуальную плодовитость самки. Яйца инкубировали и полученных гусениц выкармливали. Полученные результаты содержатся в таблице 4.

Из таблицы видно, что показатели Херсонской популяции выше, чем у Красноградской. Из этого следует, что при отборе на стадии куколки преимущество необходимо отдавать популяции, которая имеет большую массу куколки, так как это имеет существенное влияние на жизнеспособность потомства.

При оценке материала на стадии имаго в основу ис-

Т а б л и ц а 3. Зависимость между восстановительной активностью гемолимфы тутового шелкопряда и его жизнеспособностью (среднее за 1994—1995 гг.)

Table 3. Dependence between gypsy moth haemolymph $KMnO_4$ recovering activity and viability (average in 1994—1995)

Порода	Восстановительная активность гемолимфы (время обесцвечивания $KMnO_4$, сек)	Фактическая жизнеспособность, %
Б-1 улучшен.	6,0±0,2	74,5±0,4
Б-2 улучшен.	6,2±0,3	75,6±0,5
М-6	5,9±0,2	73,6±0,4
М-7	5,4±0,2	76,8±0,5
М-8	5,8±0,1	73,2±0,3
Укр-1	5,3±0,2	72,9±0,8
Укр-2	4,0±0,1	83,0±1,2
Укр-13	8,1±0,4	70,7±0,9

Т а б л и ц а 4. Характеристика основных биологических показателей американской белой бабочки разных популяций (среднее за 1993—1995 гг.)

Table 4. Main biological indices in different populations of White tiger moth (average in 1993—1995)

Показатели	Красноградская	Херсонская
Средняя масса куколки-самки, мг	103,9±4,5	138,0±8,1
Средняя масса куколки-самца, мг	72,5±4,9	86,3±5,2
Соотношение полов, ♀♂	1:1,3	1,7:1
Выход имаго, %	83,4±2,0	87,6±11,9
Плодовитость самки, шт.	1120±19	1380±40
Отрождение гусениц, %	83,4±2,0	87,6±1,9
Жизнеспособность гусениц, %	81,4±1,8	83,4±1,1

Т а б л и ц а 5. Зависимость между активностью дыхания сперматозоидов тутового шелкопряда и его жизнеспособностью (среднее за 1994–1995 гг.)

Т а б л и ц а 5. Dependence between spermatozoa respiration activity and viability of silkworm (average in 1994–1995)

Порода	Активность дыхания сперматозоидов (время обесцвечивания метиленовой синьки, сек)	Жизнеспособность гусениц, %
Б-2 улучшен.	1,7 ± 0,1	94,3 ± 1,2
М-8	2,1 ± 0,2	92,0 ± 1,0
Японская А	2,5 ± 0,1	90,0 ± 0,8
Укр-13	4,0 ± 0,3	79,9 ± 0,7
Укр-13	8,1 ± 0,4	70,7 ± 0,9

следований была положена установленная ранее зависимость между степенью чувствительности самцов тутового шелкопряда к запаху полового феромона самки и жизнеспособностью потомства, которое от него получается (Злотин и др., 1981). Разработанный метод мы использовали для оценки имаго-самцов непарного шелкопряда.

Согласно принятой методике (Злотин и др., 1981) был приготовлен экстракт полового феромона самки непарного шелкопряда. Методом разведения активность полученного экстракта была доведена до $1 \cdot 10^{-10}$. Из Севастопольской популяции было выделено 2 группы самцов: Наличие ответной реакции самцов определяли по тестовым признакам: движение антенн, крыльев, брюшка и др. Самцы, которые реагировали на феромон в такой концентрации, составили первую группу — “условно

сильные”; самцы, которые не реагировали на феромон в такой степени разведения, — “условно слабые”. Самцов каждой группы спарили с самками, и их потомство выкармливали отдельно, ведя учет биологических показателей. Было установлено, что потомство самцов “сильной группы” по жизнеспособности гусениц достоверно превышает потомство “слабой группы” ($83,1 \pm 1,1\%$ против $72,1 \pm 1,8\%$). Такие же результаты получены и по жизнеспособности куколок ($77,2 \pm 1,7\%$ против $64,2 \pm 0,9\%$), и по проценту яйцекладущих самок ($40,0 \pm 1,0\%$ против $37,3 \pm 0,6\%$).

На основе полученных результатов данный метод может рассматриваться как эффективный способ определения физиологического состояния популяции и отбора исходного высокожизнеспособного материала.

Для оценки имаго-самцов нами был предложен еще один метод — по активности дыхания сперматозоидов, которая определяется по скорости обесцвечивания сперматозоидами метиленовой синьки (Шулимов, 1967). Сперматозоиды во время своего дыхания забирают кислород метиленовой синьки, и она обесцвечивается. Соответственно, более быстрое ее обесцвечивание свидетельствует о более интенсивном дыхании сперматозоидов и высокой оплодотворяющей способности.

Т а б л и ц а 6. Зависимость биологических показателей культур тутового шелкопряда, созданных с помощью методов отбора и отобранных случайно (среднее за 1994–1995 гг.)

Т а б л и ц а 6. Dependence between biological indices of the two silkworm cultures created by selection and randomly chosen (average in 1994–1995)

Показатели	Укр-1		Укр-2	
	с отбором	без отбора	с отбором	без отбора
V_1 , %	89,7 ± 0,3	85,3 ± 0,4	90,7 ± 0,2	87,0 ± 0,3
V_2 , %	83,4 ± 1,7	78,0 ± 1,5	91,4 ± 1,4	86,8 ± 1,1
V_3 , %	96,8 ± 0,5	91,7 ± 1,1	95,9 ± 0,4	93,7 ± 0,2
V_4 , %	72,4 ± 1,5	61,7 ± 1,4	79,5 ± 1,2	76,3 ± 1,9
N , %	49,7 ± 2,1	43,5 ± 1,7	41,1 ± 2,3	35,7 ± 2,2
F , шт.	715,2 ± 12	689,5 ± 10	769,0 ± 12	743,3 ± 10
R , раз	257,3 ± 12,9	185,1 ± 8,8	251,3 ± 15,1	202,5 ± 13,7

Опыт проводили на 4 породах тутового шелкопряда. От полученных после выкармливания самцов отбирали сперму, используя реципрокных самок. Сразу после спаривания у самки вырезали копулятивную сумку, к содержимому сперматофора добавляли каплю 0,01%-ного раствора метиленовой синьки, и полученную смесь набирали в тонкий стеклянный капилляр. Качество спермы определяли по скорости обесцвечивания метиленовой синьки. Результаты опыта отражены в таблице 5.

В условиях данного опыта время обесцвечивания метиленовой синьки соответствует жизнеспособности гусениц. Между признаками была установлена корреляция, коэффициент которой равен 0,986. Данный метод можно рекомендовать как способ отбора высокожизнеспособных имаго-самцов насекомых для создания культур насекомых.

Для подтверждения эффективности и целесообразности проведения отбора мы взяли 2 районированные породы тутового шелкопряда. Одну его культуру заложили с использованием самцов, которые реагировали на запах минимальной концентрации полового феромона (активность $1 \cdot 10^{-10}$). Их спарили с самками, которых после откладки грены проверили на устойчивость к летальному действию ДДВФ (Злотин и др., 1974). Грену от "сильных" самок инкубировали и проводили выкормку гусениц. Вторую культуру создали из случайно отобранного материала. После завершения полного цикла развития полученные показатели ввели в формулу общей жизнеспособности и перспективного роста численности популяции. Расчеты приведены в таблице 6. Сравнения показателей общей жизнеспособности и перспективного роста численности популяций показало, что они достоверно выше у культуры, материал для создания которой был отобран с использованием рекомендованных методов.

Для сохранения высокого уровня гетерогенности и обеспечения высокой жизнеспособности необходимым условием является определение приблизительной численности изолята для создания стартовой культуры. Этот вопрос в технической энтомологии до сих пор является неразрешенным (Leonard, 1966; Руснак, 1987).

Для сравнения биологических показателей нами было создано 2 стартовых колонии Севастопольской популяции непарного шелкопряда с разным начальным количеством особей — 500 и 2500 шт. Гусениц выкармливали в одинаковых условиях до полного завершения цикла развития на протяжении 6 генераций. Учет биологических параметров показал, что их ухудшение в стартовой колонии из 500 особей началось в 3-й генерации, а в 6-й популяция погибла от активации латентной вирусной инфекции и инбридинга. Биологические показатели колонии с численностью 2500 особей в процессе культивирования резких изменений не ощутили, и культура сохранилась с достаточным уровнем жизнеспособности. Поэтому при создании культуры непарного шелкопряда необходимо брать не меньше 2500 особей для сохранения генофонда и предотвращения генетической элиминации.

Таким образом, экспериментально доказано, что предложенные нами приемы позволяют отобать высокожизнеспособный материал для создания культур насекомых, что обеспечит успех реализации их в разнообразных программах технической энтомологии.

Бойчук Ю. Д. Принципи і методи добору вихідного матеріалу для культивування комах: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Харків, 1996. — 25 с.

Злотин А. З., Кораблева Е. С., Акименко Л. М. Новый способ отбора высокожизнеспособного потомства тутового шелкопряда // Докл. ВАСХНИЛ. — 1974. — № 3. — С. 31–32.

Злотин А. З., Акименко Л. М., Браславский М. Е. Отбор высокожизнеспособных имаго-самцов тутового шелкопряда по чувствительности к бомбиколу // Тр. ВЭО. — 1981. — 63. — С. 185–186.

Злотин А. З. Техническая энтомология. — Киев: Наук. думка, 1989. — 184 с.

Злотин А. З., Чепурная Н. П. Общие принципы контроля качества культур насекомых // Энтотомол. обозрение. — 1994. — № 1. — С. 195–197.

Руснак А. Ф. Аспекты генетики массового разведения трихограммы // Защита растений. — 1987. — № 5. — С. 30–34.

Тамариша Н. А. Основы технической энтомологии. — М.: Изд-во МГУ, 1990. — 208 с.

Шушумов А. Г. Методика оценки качества семени крупного рогатого скота. — Харьков, 1967. — 72 с.

Leonard D. E. Differences in development of the gypsy moth, *Portheria dispar* (L.) // Conn. Agr. Exp. Sta. Bull. — 1966. — 680. — P. 1–31.