

# ІНДИКАЦІЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ

## ентомопатогенних нематод Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae (огляд літератури)

**Мета.** Здійснення теоретико-методологічного аналізу існуючих наукових даних щодо особливостей використання методів, спрямованих на індикацію (виявлення) та ідентифікацію корисних для захисту рослин мікроорганізмів — ентومопатогенних нематод (Rhabditida: Steinernematidae & Heterorhabditidae) (ЕПН). **Результати.** Наведено огляд літератури, де описано актуальні методики, які застосовуються для дослідження фауни ЕПН, вказано на їх переваги та обмеження. Єдиного стандарту для багатьох методів, що обговорюються в даній роботі, наразі не існує, тому розглянуто різні підходи, ефективність яких була підтверджена експериментально і вважається задовільною. Передусім описано методи відбору проб ґрунту та зразків комах-хазяїв, заселених нематодами, й техніки ізоляції/виділення ЕПН із різних типів проб. Далі обговорюються найбільш важливі систематичні ознаки ЕПН, підходи до їхнього визначення та основні методи, необхідні для рутинної видової ідентифікації, у першу чергу — виготовлення мікропрепаратів та їх дослідження методами світлової мікроскопії. Описано методики електронної мікроскопії, кросбридингу та молекулярно-генетичних досліджень ЕПН. **Висновки.** Наведені дані мають важливе теоретичне та практичне значення, оскільки дозволяють здійснити обґрунтований вибір найбільш оптимальних способів пошуку, виявлення та ідентифікації ентومопатогенних нематод (Steinernematidae, Heterorhabditidae) — потенційних біоагентів проти комах-шкідників.

**пошук та виявлення; ізоляція (виділення); штучне зараження; біозахист; комах-шкідники**

**Значення та таксономічне положення ентومопатогенних нематод (Rhabditida: Steinernematidae & Heterorhabditidae).** Ентومопатогенні нематоли (Rhabditida: Steinernematidae та Heterorhabditidae) — ендопаразити (енто-

---

**А.М. КОВТУН**  
 Одеський державний аграрний  
 університет, вул. Канатна, 99, м. Одеса,  
 65012, Україна  
 e-mail: andrii\_kovtun@ukr.net

---

мопатогени) комах та інших артропод (Arthropoda), виступають облігатними хазяями для кишкових грам-негативних симбіотичних бактерій з родів *Xenorhabdus* та *Photorhabdus* (γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae), утворюючи з ними мутуалістичний нематодно-бактеріальний комплекс [1, 2].

Значна кількість ізолятів цих ентومопатогенів, виділених із загинувших комах-шкідників під час масових епізоотій в природі, стали основою створення біологічних препаратів (біопестицидів) інсектицидної дії для захисту рослин сільськогосподарського та інших призначень, багаторічних і лісових насаджень, дерев, чагарників, рослинності закритого ґрунту тощо [3–5]. Ентومопатогенні нематоли (ЕПН) з роду Steinernematidae Chitwood et Chitwood, 1937 (= Neoalectanidae Sobolev, 1953) та Heterorhabditidae Poinar, 1976 мають широкий спектр хазяїв, ними уражаються понад 200 видів комах на різних стадіях розвитку з різних родин [6, 7]. Також володіють іншими антибіотичними властивостями (нематотичними, фунгіцидними та бактерицидними зокрема), які досі вивчені недостатньо [8–11]. Разом з тим, завдяки короткій тривалості життя і простоті процесу лабораторного культивування, вони все частіше використовуються як модельні організми у фундаментальних дослідженнях симбіозу і паразитизму.

Тривалий час ці нематоли залишалися маловивченими із-за складності їх виявлення і діагностування, що зумовлено особливостями їхньої біології. ЕПН Steinernematidae та Heterorhabditidae досить подібні між собою, проте сам тип трофічного зв'язку з комахами-хазяями виник у цих двох групах незалежно один від одного. Нематоли родини Heterorhabditidae — це родичі нематоли *Caenorhabditis elegans*, а Steinernematidae — близькі до ґрунтових нематод-панагролаймід [1]. Представники ЕПН ведуть прихований спосіб життя — розвиток личинок і дорослих особин розірваних у просторі та часі, у зв'язку з чим виявляються або тільки інвазійні личинки у ґрунті, або ж їхні дорослі стадії — в личинках і лялечках комах-хазяїв. Відповідно до цього, перші знахідки ентонематод були пов'язані з аналізом причин загибелі різних комах, їх розтинном та подальшим виділенням з трупів жертв. Обстеженням ґрунтів з метою виділення інвазійних личинок дослідники почали займатися вже після однозначного встановлення життєвих циклів їхнього розвитку [12].

Таксономічно ЕПН належать до типу Nematoda Diesing, 1861, класу Chromadorea Inglis, 1983, підкласу Chromadoria Pearse, 1942, ряду Rhabditida Chitwood, 1933 [27]. Нижче наведено перелік таксонів ЕПН. Після назви родів у дужках вказано кількість валідних видів у світовій фауні / кількість видів у фауні України, відомих за літературними даними.

<b>Тип: NEMATODA Diesing, 1861</b>
Клас: CHROMADOREA Inglis, 1983
Підклас: CHROMADORIA Pearse, 1942
Ряд: RHABDITIDA Chitwood, 1933

Підряд: RHABDITINA Chitwood, 1933
Інфраряд: RHABDITOMORPHA De Ley & Blaxter, 2002
Надродина: RHABDITOIDEA Örley, 1880
<b>Родина: STEINERNEMATIDAE Filipjev, 1934 = NEOAPLECTANIDAE Sobolev, 1953</b>
<b>Рід: <i>Steinernema</i> Travassos, 1927 (n = 95/3) = <i>Neoalectana</i> Steiner, 1929</b>
<b>Рід: <i>Neosteinernema</i> Nguyen &amp; Smart, 1994 (n = 1/0)</b>
Надродина: STRONGYLOIDEA Baird, 1853
<b>Родина: HETERORHABDITIDAE Poinar, 1976</b>
<b>Рід: <i>Heterorhabditis</i> Poinar, 1976 (n = 16/1) = <i>Chromonema</i> Khan, Brooks &amp; Hirschmann, 1976</b>

Більшість ідентифікованих видів ентомопатогенних нематод (близько 100) належать до типового роду *Steinernema* Travassos, 1927 родини Steienerematidae, і у 5 разів менше до типового роду *Heterorhabditis* Poinar, 1976 родини Heterorhabditidae. На території України зареєстровано лише чотири види ЕПН: три представники — *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts et al., 1982, *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts et al., 1982, *Steinernema arenarium* (Artyukhovsky, 1967) Wouts et al., 1982 роду *Steinernema* родини Steienerematidae та один — *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 роду *Heterorhabditis* родини Heterorhabditidae [28—32].

ЕПН досі залишаються мало вивченою групою нематод-рабдитид України широким загалом спеціалістів-біологів (зоологів, гельмінтологів зокрема) як у відношенні первинних фауністичних даних, так і щодо прикладних аспектів. Це зумовлено, насамперед, складністю освоєння цієї своєрідної екологічної групи червів, їх прихованим способом життя і не частим траплянням у природі. Інша причина, що не менш важливо, — це необізнаність та безініціативність фахівців науки і практики агробіологічного й екологічного профілів щодо перспектив і можливостей застосування ЕПН проти певних видів шкідників. Ці методи не надто «популярні» в захисті рослин і ще досі не знайшли належного місця у вітчизняному мікробіозахисті

сільськогосподарських культур [13, 14].

Нині поступово змінюється загальна концепція захисту рослин. Головна її суть полягає не у знищенні комах, а в управлінні їхньою чисельністю. Наголос робиться на відновленні, збереженні й підтриманні саморегуляції біоценозів (агроценозів), а конкретніше — тих рушійних сил у них, котрі здатні стримувати масове розмноження шкідників. Така мета може бути досягнута тільки комплексом відповідних засобів і прийомів, підібраних на основі глибоких знань про процеси у біоценозах [15—17]. У цю концепцію, що отримала назву «інтегрований захист рослин», доцільно вписуються в якості одного із компонентів ЕПН. Інтегрований захист передбачає використання, наскільки це можливо, більш вибіркового впливу на шкідників. ЕПН є екологічно чистою альтернативою хімічним інсектицидам широкого спектра дії, які дозволяють управляти шкідниками, не впливаючи, чи впливаючи мінімальною мірою на інші нецільові організми біоценозу [5, 14, 18].

Світовий досвід свідчить, що інтегрований захист рослин неможливий без використання надійних методів індикації (виявлення), максимально точної видової ідентифікації, прогнозу щільності не тільки шкідливих, а й корисних організмів в агроекосистемах, ЕПН зокрема [19—24]. Виявлення та ідентифікація аборигенних ізолятів і видів ЕПН, адаптованих до місцевих ендемічних та екзогенних факторів навколишнього середовища та клімату, є важливою умовою їхнього успішного впровадження в якості агентів біометоду для контролю комах-шкідників у інтегрованих системах фітозахисту.

Аналіз доступної вітчизняної наукової літератури засвідчив про загальний недостатній рівень роботи у даному напрямі. Нині дослідники [25, 26] пропонують деякі способи та методи, спрямовані на вивчення ЕПН (дослідження ґрунту, виділення нематод, морфологічна диференціація видів).

Проте цілісного ґрунтового дослідження, яке б повною мірою висвітлювало питання індикації та ідентифікації цільових ЕПН, досі немає. Враховуючи суттєвий брак такої інформації, *метою дослідження* було здійснити аналіз наявних результатів досліджень щодо особливостей використання методів, спрямованих на індикацію та ідентифікацію корисних для захисту рослин мікроорганізмів — ентомопатогенних нематод (Rhabditida: Steinernematidae & Heterorhabditidae).

Даний огляд складається з чотирьох основних розділів:

1. Пошук та виявлення ЕПН;
2. Ізоляція ЕПН із проб ґрунту та виділення із загинувших комах;
3. Штучне інфікування тест-комах ізолятами ЕПН;
4. Ідентифікація ЕПН.

### 1. Пошук та виявлення ЕПН

У ЕПН (Steienerematidae та Heterorhabditidae) розвиток личинок і дорослих особин розриваний у просторі та часі, у зв'язку з чим виявляються або тільки інвазійні личинки в ґрунті, або ж дорослі стадії — в личинках і лялечках комах-хазяїв. Загальновідомо, що різні види з двох родин ЕПН спромоглися зайняти один і той самий регіон, і навіть той же квадратний метр, але співіснують, тому що знаходяться на різній глибині ґрунту або мають різну гостальну специфічність (спеціалізацію живлення), тобто залежать від різних видів комах-хазяїв, які безпосередньо підтримують їхню популяцію. З огляду на це існують три базових способи виявлення ЕПН, а саме: (1) безпосередній відбір проб ґрунту; (2) закладання ґрунтових «живих» пасток; (3) збір (відловлювання) потенційних комах-хазяїв.

**Відбір ґрунтових проб.** Спосіб відбору проб залежить від мети, яка ставиться перед дослідником у кожному окремому випадку. Відбирають проби за двома схемами — випадкова (рандомізована) і систематична (суцільна). Випадкову схему доцільно за-

стосовувати на великих площах (наприклад, географічних областях чи регіонах) для вивчення впливу на різноманітність ЕПН певних факторів — діапазону висот, текстури ґрунту чи типу середовища існування (наприклад, оброблені поля, лісові масиви, пасовища, парки, прибережні райони тощо). Ґрунтові проби за рандомізованою схемою доцільно відбирати таким чином [33]. Для формування середнього зразка (об'ємом  $500 \text{ cm}^3$ ) відбирають разові проби (5 виїмок) із  $4 \text{ m}^2$  за допомогою звичайної ручної лопати. У більшості випадків проби ґрунту слід відбирати з верхнього шару ґрунтового профілю до глибини 15–30 см (основної зони росту коріння рослин). У насадженнях деревних рослин проби ґрунту відбирають до глибини 40 см у радіусі 1 м навколо штабів дерев, що ростуть окремо (рис. 1). Проби ґрунту можуть бути як точковими (відібрані за один прийом з одного місця), так і об'єднаними (суму спільних точкових порцій-проб із однієї типової ділянки змішують разом). Умови відбирання проб мають бути однаковими в усіх варіантах. Визначають та фіксують місця відбору проб ґрунту (координати точок відбору). До кожної проби ґрунту додається супровідний листок, в якому зна-

чаються відомості про тип ґрунту, тип рослинності (сільськогосподарської культури), порядковий номер, дата відбору, глибина відбору тощо. Ґрунтову пробу (об'єднану пробу) разом з етикеткою направляють на аналіз в лабораторію.

Важливим етапом є правильний вибір часу (сезонність) відбору проб. Ентомопатогенним нематодам властива горизонтальна й вертикальна міграція у ґрунті, що залежить, у першу чергу, від температури та вологості навколишнього середовища. Відповідно, на території України відбір проб ґрунту проводять з квітня по жовтень, коли ентомопатогени найбільш масово знаходяться на глибині відбору проби.

На відміну від рандомізованого відбору ґрунтових проб, систематичний, як правило, доцільно застосовувати в якості спеціального дослідження у конкретній (демаркованій) області протягом визначеного періоду часу [33]. Наприклад, для оцінювання сезонного розподілу ЕПН у ґрунті на елементарній ділянці (полі) взяття проб передбачається через певні інтервали у часі та просторі. Репрезентативність проб має забезпечувати вивчення розподілу популяцій ЕПН якомога детальніше. Точність нематологічного обстежен-

ня значною мірою залежить від площі елементарної ділянки та кількості відібраних з неї точкових (індивідуальних) проб, з яких складається репрезентативний змішаний (об'єднаний) зразок ґрунту для нематологічного аналізу. Як засвідчив аналіз літератури [2, 33], єдиного спільного стандарту щодо процедури відбору проб ґрунту немає. Тому вважаємо необхідним створення «локального стандарту» залежно від зони, ґрунтово-кліматичних умов, типу біоценозу тощо.

**Закладання ґрунтових «живих» пасток.** Для виявлення ЕПН застосовують метод ґрунтових «живих» пасток із використанням сприйнятливих тест-комах, що мешкають поза ґрунтом. Такі комахи найбільш чутливі до інфекції ентомопатогенів у ґрунті, що в свою чергу підвищує результативність даного методу порівняно із безпосереднім відбором проб ґрунту. У якості відповідних хазяїв можна розглядати личинки великої воскової молі *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), або ж незрілі стадії інших видів комах з різних родин та/або рядів (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera тощо).

По дві особини личинок *G. mellonella* останньої вікової стадії (вагою  $0,20 \pm 0,03 \text{ г}$ ) поміщають у сферичні капсули (діаметром 4,5 см) з металеві сітки і закопують у ґрунт на глибину до 10 см у ценозах польових угідь, та на глибину до 20–30 см в радіусі 1 м від штабу дерева, куща (у садових ценозах, групових насадженнях тощо), позначивши місце їхнього знаходження. У якості подібних капсул рекомендують використовувати металеві ситечка для заварювання чаю (рис. 2) [2]. Через 5–6 діб тест-комах виймають для подальшого аналізу в лабораторних умовах.

**Збір (відловлювання) потенційних комах-хазяїв.** Перевага даного методу полягає в тому, що інформація про гостальну специфічність та патогенність ЕПН отримується безпосередньо від комах-хазяїв, заражених у природних умовах. Метод дає змогу

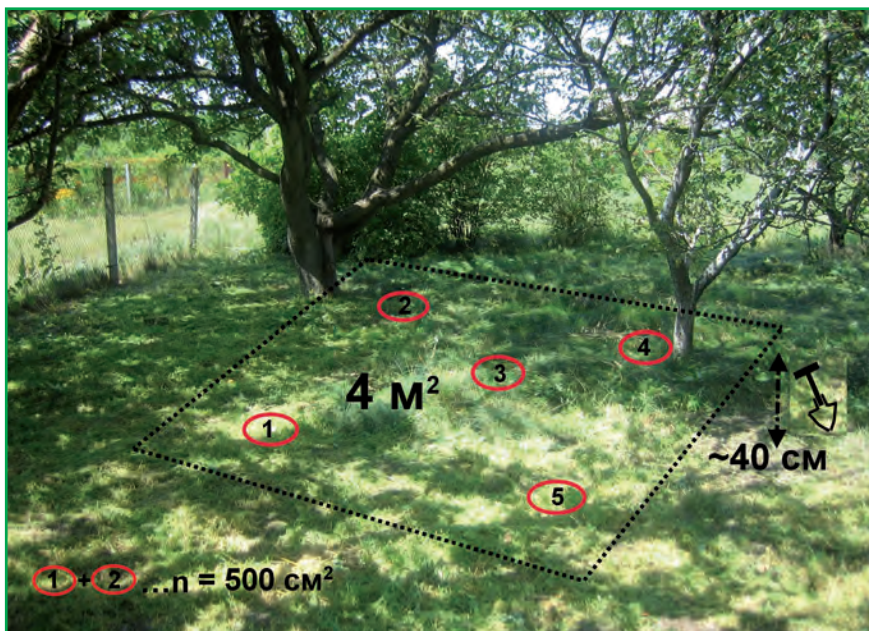


Рис. 1. Особливості відбору проб ґрунту за рандомізованою схемою у насадженнях плодоносного саду (фото автора)



**Рис. 2.** Загальний вигляд ґрунтових «живих» пасток із вміщеними личинками *G. mellonella* (фото автора)

отримати ізоляти ЕПН, специфіка яких зумовлюється специфікою хазяїна, у якому вони були виявлені, що не може бути виявлено, наприклад, методом «живої» пастки.

Для цього рекомендується використання еколого-ентомологічних обстежень [35] із обліком комах у ґрунті, його поверхні, чи на рослинах із застосуванням способів збору універсальних, у результаті яких водночас вилучуються найрізноманітніші групи комах (ручний розбір, метод просівання ентомологічним ситом, флотажія), та спеціальних, які враховують особливості біології представників конкретних родин і родів (концентруючі

(притіняючі) приманки, ловчі по-яси). Обстежуючи деревний ярус, відбирають комах, струшуючи їх на полотно. Для цього під деревом чи кущем розкладають біле полотно і трусять гілку рукою чи б'ють по ній палицею. Комах, які падають, збирають пінцетом або безпосередньо руками і поміщають у завчасно приготовлені пробірки тощо.

Відомо, що особливо висока інтенсивність та екстенсивність ураження ЕПН спостерігається серед тих комах-хазяїв, життєвий цикл розвитку яких пов'язаний з ґрунтом, для більшості личинок яких характерний прихований спосіб життя у верхньому шарі ґрунту [36, 37]. Зважаючи на це, слід використовувати прямі та/чи не прямі методи обліку ґрунтових комах.

Прямим способом обліку ґрунтових комах є викопування квадрата  $50 \times 50$  см (в аридних умовах  $100 \times 100$  см) і пошарове дослідження ґрунту, який одразу ж поміщають у поліетиленові пакети. Одним із непрямих методів обліку великих ґрунтоживучих комах (дротяників і личинок хрущів зокрема) є так званий «облік за плугом» — у шарі ґрунту борозни, що утворилась. Оглядають усіх наявних комах, знайдених хворих чи загинлих збирають пінцетом або безпосередньо руками, поміщають у заздалегідь підготовлені банки чи пробірки.

Збір хворих і загинлих комах-хазяїв базується на використанні візуальних ознак ураження ЕПН, які за літературними і оригінальними даними [38] мають свої характерні особливості (у порівнянні із іншими патологіями комах) (рис. 3). Симптоми, що спостерігаються в комах при ураженні їх нематодами з родин *Steinernematidae* та *Heterorhabditidae*, залежать від видової належності паразита, фази розвитку, віку і виду комах-хазяїна. Основними явними ознаками нематодної інфекції є: характерна зміна кольору зовнішніх покривів тіла уражених комах на яскравий малиново-червоний (характерно для *Heterorhabditidae*) чи різні града-

ції жовто-сірого (характерно для *Steinernematidae*); зміна розмірів і форми трупів тіла комах (уражені особини дещо збільшуються в об'ємі; тіла розбухають і набувають м'якої, пружної гумоподібної консистенції, оскільки внутрішні органи під дією бактерій-симбіонтів перетворюються на мутну рідину); відсутність будь-якого специфічного запаху у свіжо-загнених комах.

Варто зазначити, що у природі шанси знайти комах, уражених ЕПН, становлять в середньому менше 3% [33], за винятком виникнення широкої спонтанної епізоотії із значною екстенсивністю інвазії [39] або дослідження великої вибірки комах [40].

Усі відомі знахідки ЕПН в Україні були пов'язані лише з



**Рис. 3.** Прояв нематодної інфекції на личинках *Galleria mellonella*:

а — збудник з родини *Steinernematidae*;  
б — збудник з родини *Heterorhabditidae*;  
в — не уражені (інтактні) особини *G. mellonella* (фото автора)

аналізом проб ґрунту, відібраних у різних біоценозах [28—32]. Ентомологічні обстеження мікроценозів комах з подальшим встановленням причин загибелі та відбір загиблих особин за типовими для ЕПН ознаками ураження до цього часу не проводилися, ця інформація й досі лишається «білою плямою» ентономатології в Україні. До того ж, як показав аналіз вітчизняних літературних даних, досі не зафіксовано випадків епізоотій, викликаних ЕПН, окрім однієї, викликаної 80 років тому (!), у 1952 р. на посівах буряків цукрових Веселоподільської селекційної станції (Семенівський р-н, Полтавська обл.) серед личинок бурякових довгоносиків (*Bothynoderes punctiventris* Germ.) [41].

## 2. Ізоляція ЕПН із проб ґрунту та виділення із загиблих комах

З метою ізоляції ЕПН із відібраних проб ґрунту застосовують два основних методи:

- 1 — метод біопробу (біотестування);
- 2 — лійковий метод за Берманом у лабораторних умовах (рис. 4).

Застосовуючи перший метод — біотестування, ґрунтові проби ретельно перемішують, вилучають різноманітні камінці, залишки рослин та відбирають 500 см<sup>3</sup>, заповнюючи пластикові стакани, у кожен з яких вносять по 3—5 личинок старшого віку великої воскової моли *Galleria mellonella* (або ж незрілі стадії інших видів комах з різних родин та/або рядів Lepidoptera, Coleoptera, Diptera). Ґрунт, за необхідності, зволожують відстояною водопровідною водою за допомогою ручного обприскувача, з метою підвищення здатності нематод до руху в напрямку жертв. Стакани з ґрунтом обв'язують бяззю і розміщують на піддоні, перевертаючи догори дном. Кожен стакан підписують (дата та місце відбору проб) і залишають для експозиції на 5—6 діб. Кожного дня оглядають стан гусениць, вилучають загиблих та замінюють їх новими (рис. 5). Також, з метою ізоляції ЕПН із

відібраних ґрунтових проб у лабораторних умовах, автори [34] пропонують для цього модифікований метод із застосуванням вище зазначених чайних ситечок, які використовувалися у польових умовах як ґрунтові «живі» пастки (див. 1. Пошук та виявлення ЕПН рис. 2).

Для виявлення вільноживучих інвазійних личинок ЕПН використовують свіжовідібрані вологі ґрунтові проби і застосовують лійковий метод Бермана (рис. 4). Даний метод є широко використовуваним у нематології для виділення інших груп червоподібних видів нематод [42].

Для цього пробу ґрунту (об'ємом близько 50 см<sup>3</sup>) розміщують на молочний фільтр (або туалетний папір) та поміщають на металеву сітку, яку у свою чергу занурюють у лійку, заповнену водою. На вузький кінець лійки прикріплюють гумову трубку разом з приєднаною до неї хімічною пробіркою. Лійку із ґрунтом залишають на 72 год для виходу нематод у воду та подальшого осідання їх на дно пробірки.

Після цього пробірки знімають та аналізують [42].

Провівши порівняння основних методів ізоляції ЕПН із ґрунту, дійшли висновку, що більш зручним у практичному застосуванні є метод біопробу порівняно з лійковим методом Бермана, при використанні якого дослідник стикається з багатьма труднощами (табл.).

Для виділення нематод із загиблих комах-хазяїв є два загальні способи — застосування «водної пастки» Уайта, або ж проведення «гельмінтологічного розтину» (рис. 6).

Водна пастка Уайта — це чашка Петрі (Ø100 мм), заповнена 20 мл дистильованою водою, у яку вставлена перевернута чашка Петрі меншого розміру (Ø50 чи Ø60 мм) з вологим фільтрувальним папером посередині, на якому розміщуються комахи із симптомами нематодної інфекції (див. рис. 3). Через 10—25 діб (залежно від виду і штаму ЕПН) спостерігають за евазією та подальшою міграцією інвазійних личинок (ІЛ) по вологому філь-

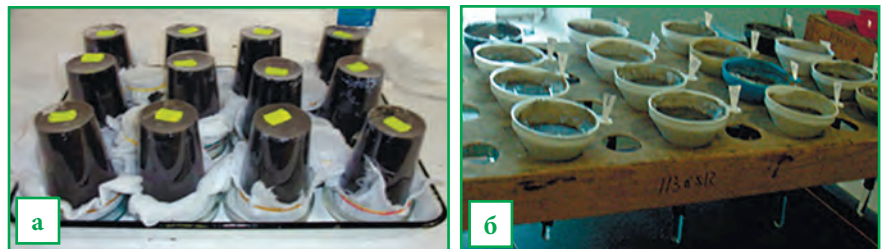


Рис. 4. Ізоляція ентомопатогенних нематод із проб ґрунту:

а — метод біопробу; б — лійковий метод Бермана (фото автора)



Рис. 5. Загибла личинка великої воскової моли *Galleria mellonella* з ознаками ураження *Heterorhabditis* sp. при використанні методу біопробу (фото автора)

Порівняльна оцінка основних методів ізоляції ЕПН з ґрунту

Критерії	Методи	
	лійковий Бермана	біопроба
Виділення нематодної популяції	Різномірна	Одна
Складність роботи	Висока	Низька
Створення лабораторної культури	Можливе	Так
Стадії виділення	Дауер-личинка	Усі
Рівень таксономічних знань	Високий	Помірний
Можливість таксономічних робіт	Ні	Так
Кількісні дані	Так	Так

травальному паперу в шар води (прояв позитивного гідротаксису) на дні більшої (Ø100 мм) чашки Петрі (рис. 6). Не дивлячись на те, що застосування водної пастки Уайта для виділення ентомопатогенних нематод було обґрунтовано майже 100 років тому [43], даний метод використовується і дотепер і вважається найбільш результативним. Деякі вчені [33] пропонують власну модифікацію даного методу.

Усі виявлені ізоляти ЕПН зберігають окремо у вигляді водної суспензії в 250 мл конічних колбах в холодильнику при температурі 4°C у 0,001% розчині формаліну у фізіологічному розчині кухонної солі з концентрацією 1000–3000 екз. нематод/мл. У таких умовах ІЛ досить довго

(від 6 до 12 місяців) зберігають свою життєздатність. Також, як повідомляють автори [2], для зберігання культури нематод придатні й шматочки губки, просочені водною суспензією ІЛ з розрахунку 500–1000 екз. нематод/см<sup>2</sup> губки в щільно закритому поліетиленовому пакеті, щоб уникнути зневоднення. За температури 5°C–10°C тривалість життя інфекційних стадій становить від 1–3 місяців до кількох років (залежно від виду і штаму ЕПН). Цей вид консервації не вимагає особливих навичок, а нематоди зберігають хорошу якість. Періодично здійснюють перевірку нематод. Зазвичай стейнернематоди зберігаються довше ніж гетерорабдитиди, без необхідності субкультивування. Останні

потребують більше періодичних перевірок при зберіганні. Турецькі вчені запропонували спосіб детектування і розпізнавання загиблих ЕПН на мікроскопічних зображеннях за допомогою комп'ютерного зору, що може стати в нагоді для оцінки життєздатності нематод під час їх лабораторного зберігання [44].

Гельмінтологічний розтин — розтин з подальшим ретельним переглядом тканин та органів під стереоскопічним мікроскопом МБС-9 (рис. 6–7) [45]. Перш ніж приступати до мікроскопування, досліджуваних комах попередньо поверхнево стерилізують для видалення сапрофітної мікрофлори, для чого швидко проводять їх через полум'я спиртівки або занурюють у дезінфікуючі рідини з наступною промивкою у стерильній воді: 70% етиловий спирт (5 хв); 5% розчин формаліну (15 хв). В комах, уражених ЕПН, у водному незабарв-

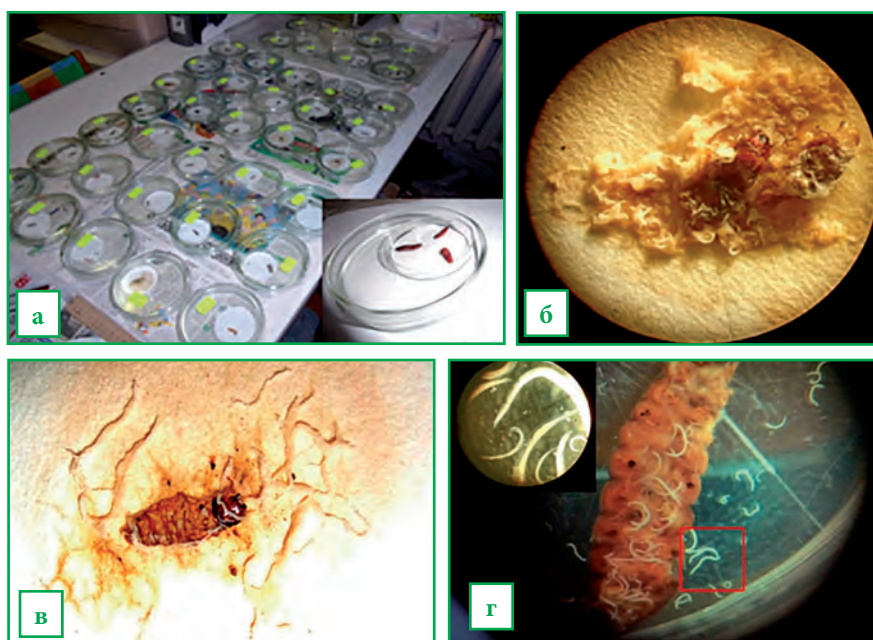


Рис. 6. Виділення ентомопатогенних нематод:

а, б, в — методом пасток Уайта (а — загальний вигляд пастки Уайта, б — вихід (евазія) ЕПН із трупа *G. mellonella*, в — міграція інвазійних личинок від залишків тіла комахи-хазяїна в сторону води (позитивний гідротаксис); г — методом гельмінтологічного розтину (виділений фрагмент більш крупним планом) (фото автора)

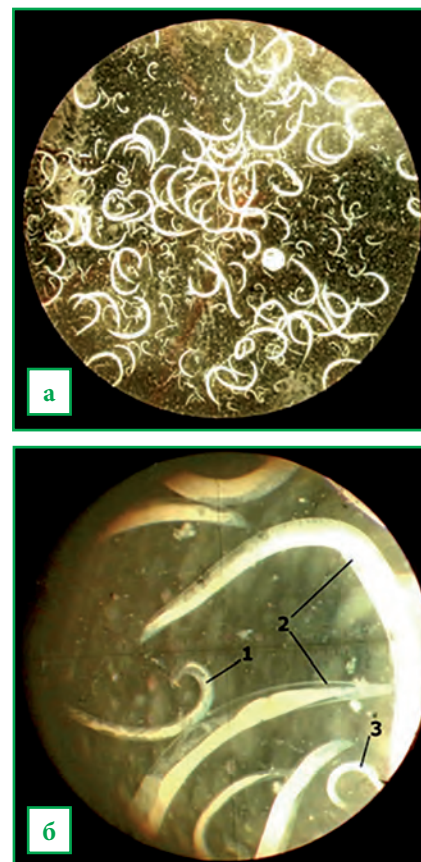


Рис. 7. Стадії розвитку гельмінтів:

а — морфологічна картина різних стадій розвитку ЕПН; б — загальний вигляд самиць (1), самиць (2) і ювенільних личинок (3) ентомопатогенних нематод (фото автора)

леному препараті, при малому та великому збільшенні мікроскопа проглядаються всі стадії розвитку гельмінтів (рис. 7).

### 3. Штучне інфікування тест-комах ізолатами ЕПН

З метою отримання різних стадій онтогенезу (1-ше та 2-ге покоління) виділених аборигенних ізолятів ЕПН, необхідних для подальшої ідентифікації, слід провести процедуру *штучного зараження тест-комах* в лабораторних умовах. У якості відповідних тест-об'єктів, зазвичай, використовують личинок *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

Для цього спочатку за допомогою просякнутої ефіром (хлороформом чи етилацетатом) шерстяної нитки анестезують дослідних комах *Galleria*, а потім обприскують суспензією нематод (з розрахунку 100 інвазійних личинок/комаху) у попередньо простерилізованих чашках Петрі з вкладеним фільтрувальним папером. Чашки Петрі із зараженими тест-об'єктами витримують у затемненому місці чи при розсіяному світлі (з метою імітації природних умов зараження в ґрунті) при кімнатній температурі (22–24°C) [46]; після чого застосовують метод *гельмінтологічного розтину* (див. 2. *Ізоляція ЕПН із проб ґрунту та виділення із загиблих комах*: рис. 6, г; рис. 7). На 2–3-тю добу після інокуляції спостерігають за утворенням першого покоління у стейнернематид (складається із самців і самиць) та гетерорабдитид (наявні тільки протерандричні гермафродити, що мають фенотип самиць). На 5–10-ту добу у стейнернематид, а дещо пізніше (на 7–10-ту добу) у гетерорабдитид спостерігають за утворенням другого покоління, що складається із самців і самиць. Зазвичай, через 7–10 діб у стейнернематид, а через 9–11 діб у гетерорабдитид утворюється ще одне — третє покоління, представлене також самцями та самицями (примітка: третє покоління не береться до уваги при визначенні видової належності). Останнє покоління

нематод вичерпує запаси їжі у трупі хазяїна і ювенільні нематоди розвиваються у так звану інвазійну личинку, яка евазує у зовнішнє середовище.

### 4. Ідентифікація ЕПН

Процес ідентифікації ЕПН на родовому рівні можна умовно розділити на *непрямі та прямі методи*. Основою *непрямого методу* є оцінка патологічного стану хазяїна, а саме: характерна зміна кольору зовнішніх покривів тіла (епікутикули) уражених комах під дією симбіотичних бактерій нематод на яскравий малиново-червоний (характерна для *Heterorhabditis* spp.) чи різні градації сірого, злегка жовтуватого кольору (характерна для *Steinernema* spp.) (див. рис. 3). Це дає можливість здійснити первинну родову диференціацію перед остаточною. Перевагою даного методу є простота використання, а його недолік — інколи не надто надійна диференціація. Наприклад, у наших дослідженнях [47] зафіксовано окремі випадки змішаної інфекції (мікст-інфекції) на комах-хазяях, які супроводжувались кількома нематодозами, що ставить під сумнів критерій надійності такого методу. Подібні випадки є дуже рідкісними і спорадичними.

Судження щодо родової (видової) належності ЕПН може вважатись остаточною лише у випадку *прямих методів* ідентифікації, зокрема шляхом використання *мікроскопічних методів*. Основою мікроскопічних методів є дослідженням анатомо-морфологічних характеристик та морфометричних параметрів із застосуванням: *світлової мікроскопії та скануючої електронної мікроскопії (SEM, англ. Scanning Electron. Microscope)*.

Для *світлової мікроскопії* виготовляють напівпостійні тотальні мікропрепарати на водно-гліцериновій основі, та переглядають їх під світловим мікроскопом. Для виготовлення мікропрепаратів, досліджуваних нематод попередньо фіксують у розчині ТАФ (2 мл триетаноламіну, 7 мл 40%

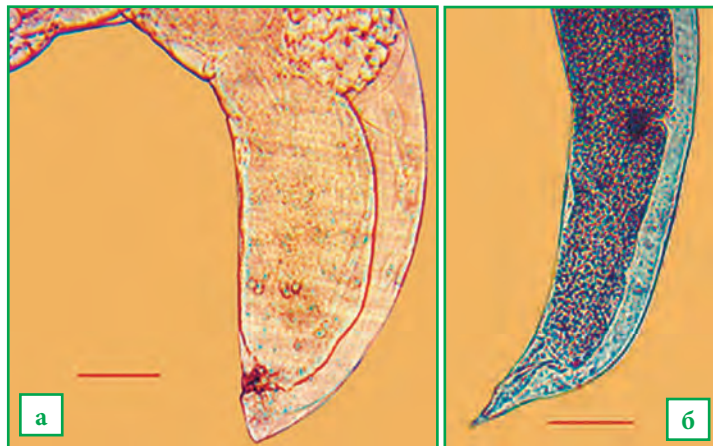
розчину формальдегіду на 91 мл дистильованої води) та витримують у закритому від прямих сонячних променів місці протягом доби. Після цього нематод відмивають у дистильованій воді та вміщують у розчин Зайнхорста №1 (95% етиловий спирт, гліцерин, дистильована вода — у співвідношенні 20:1:79) та витримують 12 год, потім переміщують у розчин Зайнхорста №2 (95% етиловий спирт та гліцерин у співвідношенні 95:5) [26]. Далі проводять вибірку нематод — не менше 10 особин личинок, самців і самиць (див. рис. 7) під біокулярною лупою, вибираючи останніх ентомологічною голкою на предметне скло в краплину розчину гліцерину (16 частин води + 1 частина гліцерину), забарвленого поліхромною синькою, і закривають покривним скельцем, останнє покривають лаком. Препарати витримують 1–2 доби при температурі не більше 40°C в термостаті, з метою рівномірного профарбовування їхньої внутрішньої будови синькою, що в подальшому полегшить процес мікроскопування.

Оглядають діагностичні ознаки та вимірюють під мікроскопом різні стадії нематод — інвазійних личинок, самців, самиць чи гермафродитних особин першої та другої генерації (рис. 8, рис. 9). З морфологічних особливостей відзначають будову латеральних полів інвазійних личинок; особливості будови та забарвлення спікул та губурнакулума, а також наявність бурси (для *Heterorhabditis* spp.), мукронального відростка на каудальній частині самців (для *Steinernema* spp.) (рис. 8); наявність епіптігми вульви, агрегованість спермій у статевих трубках самиць. Видову належність ЕПН обох родів визначають за загальноприйнятими абсолютними вимірами (і їх співвідношеннями) [48]. З урахуванням результатів вимірів основних морфологічних ознак нематод розраховують індекси: L — загальна довжина тіла; MBW — найбільша ширина тіла; EP — відстань від переднього кінця до екскреторної пори; NR — відстань від переднього



**Рис. 8. Каудальний (хвостовий) кінець тіла самців (♂):**

а — *Steinernema* sp. (сагітальний вигляд);  
б — *Heterorhabditis* sp. (фронтальний вигляд;  
світлова мікроскопія; зб.  $\times 400$ ) (фото автора)



**Рис. 9. Каудальний (хвостовий) кінець тіла самиць (♀):**

а — ♀-ї генерації *Steinernema* sp.;  
б — ♂-ї генерації *Heterorhabditis* sp. (сагітальний вигляд;  
світлова мікроскопія; зб.  $\times 400$ ) (фото автора)

кінця до нервового кільця; ES — довжина стравоходу; T — довжина хвоста; ABD — ширина тіла на рівні анального отвору; SL — довжина спікули; GL — довжина губернакулума; MUC — наявність/відсутність мукрона, його довжина;  $D\% = (EP/ES) \times 100$ ;  $E\% = (EP/T) \times 100$ ;  $GS\% = (GL/SL) \times 100$ ;  $SW\% = (SL/ABD) \times 100$ ; у т. ч. індекси Де Мана:  $a = L/MBD$ ;  $b = L/ES$ ;  $c = L/T$ .

Скануюча електронна мікроскопія (англ. SEM), за даними літературних джерел [49, 50], є дуже ефективним інструментом для візуалізації та інтерпретації певних особливостей ЕПН, які неможливо оцінити за допомогою світлового мікроскопа, і які є вкрай важливими для таксономічної ідентифікації. Автори [51] рекомендують наступний алгоритм для дослідження нематод методом SEM:

1. Готують нематод і кладуть їх у водяну ванну при  $60^{\circ}\text{C}$  на 2 хв, щоб убити;
2. Тричі промивають нематод у розчині Рінгера (pH 7,3) або фосфатним буфером (pH 7,4) (по 5 хв кожного разу);
3. Здійснюють предфіксацію у 8% глутаровому альдегіді (глутаральдегід 25% для електронної мікроскопії, розведений у розчині Рінгера);
4. Залишають нематод у цьому розчині на ніч;

5. Тричі промивають нематод у розчині Рінгера (по 5 хв кожного разу) і один раз у дистильованій воді (5 хв);
6. Здійснюють постфіксацію у 1% чотириокисі осмію ( $\text{OsO}_4$ ) протягом 2 год;
7. Постфіксовані нематоди тричі промивають у воді (по 5 хв кожного разу) і послідовно дегідратують в етанолі зростаючої концентрації (30, 50, 70, 90, 95 і 100%);
8. Проводять висушування нематод у критичній точці за використання рідкого вуглекислого газу ( $\text{CO}_2$ );
9. Переносять нематод на металеві предметні столики (англ. SEM stub) та напилюють золотом (протягом 1 год) і спостерігають у сканувальному електронному мікроскопі.

Мікроскопічні методи нині не є абсолютно визначеними, оскільки ЕПН часто проявляють значну морфолого-морфометричну мінливість за багатьма характеристиками та індексами, що ускладнює процес їхньої ідентифікації. Станом на кінець 2015 р. було описано 95 валідних видів *Steinernema* та 16 видів *Heterorhabditis* (про що було зазначено вище). Зі збільшенням кількості видів ідентифікація окремих видів стає все складнішою. Морфологічні та морфометричні характеристики можуть бути ви-

користані для ідентифікації видів роду *Steinernema*, але вони менш надійні для диференціації видів *Heterorhabditis*. Тому коректно це можна зробити, використовуючи не лише морфологічні (за загальними розмірами тіла і його пропорціями), а й методи кросбридингу, а також молекулярно-генетичні методи ідентифікації. Молекулярна характеристика необхідна для остаточного підтвердження валідності виду [27].

Більшість видів ЕПН в основному були описані з використанням Ліннеївської топологічної (морфологічної) та біологічної концепцій виду, а морфологічні/морфометричні критерії та тести на схрещування (кросбридинг) були найбільш часто використовуваними інструментами для їхньої ідентифікації. Згодом низка молекулярних методів, включаючи ізоферментні патерни, загальні білкові патерни, RFLP-аналіз, RAPD-аналіз, аналіз «сателітної» ДНК, секвенування геномної ДНК, були використані не тільки як діагностичні інструменти, але й для з'ясування філогенетичної спорідненості серед ЕПН. Нині найбільш придатною концепцією виду для використання в ентономатології є поєднання філогенетичної та еволюційної концепцій виду.

За останні роки швидкість опису нових видів ЕПН (особливо з роду *Steinernema*) над-

звичайно зросла при застосуванні молекулярно-генетичних даних (наприклад, RFLP-аналіз ITS, секвенування ITS-регіону і D2-D3 регіону). Зважаючи на цей факт, деякі вчені задаються питанням щодо потреби «перекалібрування» критеріїв виду на основі відмінностей у молекулярних послідовностях [27]. Слід наголосити, проведений аналіз літератури засвідчив, що у вітчизняних працях методи кросбридингу дослідження фауни ЕПН ніколи не розглядалися, на відміну від молекулярно-генетичних методів [26]. Тому постала гостра необхідність у детальному розгляді цього питання у контексті ідентифікації ЕПН.

Для видової ідентифікації виявлених популяцій (ізолятів) ЕПН (*Steinernematidae* та *Heterorhabditidae*) можуть використовуватися експерименти по схрещуванню (кросбридингу) [51]. Для цього, існує кілька традиційних способів, а саме: (1) пластини з ліпідним агаром, (2) використання трупів тест-комах, (3) «висяча крапля» крові та (4) перехресне запліднення у *Heterorhabditidae*. Два основних способи проведення кросбридингу (ліпідно-агарові пластинки, «висяча крапля» крові) детально описано нижче.

#### **Пластини з ліпідним агаром:**

1. Для кожного схрещування поміщають по 10 віргінільних самиць (англ. virgin) і 10 самців відповідного штаму або виду на кожну із п'яти пластинок з ліпідним агаром;
2. Проводять посів пластинок та попередню передінкубацію бактеріями фази I, виділеними зі штаму або виду нематоди, від якого походить самиця-партнер у схрещуванні;
3. Інкубують пластинки при 25°C;
4. Через три доби поміщають на кожну пластину по 10 додаткових самців, щоб переконатися, що життєздатні самці завжди доступні для запліднення самиць;
5. Кожних кілька діб спостерігають за пластинами під мі-

кроскопом на предмет появи нащадків від ауткроссу (за успішного схрещування потомство буде видно через 2—3 доби);

6. Збирають інвазійних личинок від цих схрещувань через 2 тижні;
7. Переносять на свіжі пластини з ліпідним агаром, щоб створити гібридну лінію.

Для кожного схрещування включають наступні контрольні групи:

- Тест на віргінільність (англ. virginity) / самофертильність (англ. self fertility): 10 віргінільних самиць поміщають без самців на кожну з п'яти пластинок з ліпідним агаром.
- Тест на спарювання (англ. mating test) / самосхрещування (англ. self-cross): 10 віргінільних самиць і 10 самців одного штаму або виду поміщають на пластини з ліпідним агаром, і 10 додаткових самців вносять через 3 доби.

(Примітка. Результат схрещування між різними ізолятами вважається достовірним, якщо (1) немає нащадків у тесті на віргінільність і (2) є нащадки в результаті самосхрещування).

**Використання трупів тест-комах.** Групи комах є кращим джерелом поживних речовин ніж пластинки з ліпідним агаром, а багатше середовище може допомогти у створенні гібридної лінії, коли нащадки мають низьку життєздатність.

**«Висяча крапля» крові.** Ця методика полягає в наступному:

1. Поверхнево стерилізують інвазійних личинок (ІЛ), зануривши їх у 0,1% розчин Гіаміну 10X або 1622 на 15—20 хв;
2. Здійснюють триразове промивання ІЛ у стерильній дистильованій воді;
3. Поміщають краплю гемолимфи (отриманої з поверхнево стерилізованих личинок *G. mellonella* в 95% етанолі) на покривне скло. Щоб запобігти висиханню краплі, додають до краплі

10 мл безсироваткового середовища для культури тканин комах і перемішують;

4. Поміщають 30—50 ІЛ у краплю;
5. Перевертають покривне скло догори дном і обережно поміщають на предметне скло (глибоке увігнуте предметне скло);
6. Розміщують предметне скло в чашку Петрі (100 × 15 мм) на фільтрувальний папір, змочений водою;
7. Загортають чашку в поліетиленовий пакет й інкубують при 25—27°C;
8. Поміщають окремих статевозрілих самців і самиць дослідних ізолятів у нові «висячі краплі» із статевозрілими особинами протилежної статі інших ізолятів (рекомендується співвідношення 5 самців : 5 самиць).

*Примітка.* Оцінку спарювання слід проводити протягом 10-добового періоду. Контрольні групи складаються зі схрещувань тих самих ізолятів. Наявність потомства говорить про позитивний результат, тоді як його відсутність вказує на негативний. Схрещування повинні мати достатню кількість повторень для валідності результатів.

**Перехресне запліднення у *Heterorhabditidae*.** Оскільки інвазійні личинки (ІЛ) *Heterorhabditis* spp. завжди розвиваються всередині гермафродитних самиць (т. зв. «*endotokia matricida*»), для схрещування використовують амфіміктичного типу дорослих особин другого покоління. Перехресне спарювання з гетерорабдитидами має здійснюватися з відповідним контролем, оскільки амфіміктичні самиці вже могли спаруватися, самиці другого покоління можуть давати потомство без спарювання, або може бути отримано стерильне потомство.

#### **ВИСНОВКИ**

Обидві родини — *Steinernematidae* та *Heterorhabditidae* — широко вивчаються завдяки своєму великому потенціалу в якості біологічних агентів для контролю численних комах-шкідників. Не дивлячись на те, що нині ЕПН (*Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*) успішно «пра-

цюють» у захисті рослин у багатьох країнах світу, в Україні вивчення ЕПН характеризується слабким розвитком у зв'язку з недостатньою пропрацьованістю певних теоретичних й практичних аспектів, зокрема щодо застосування актуальних методик для дослідження фауни ЕПН (методів спрямованих на їхню індикацію та ідентифікацію).

Фауністичні дослідження ЕПН (Steinernematidae та Heterorhabditidae) містять низку особливостей (прихований спосіб життя та рідкість трапляння, існування різних фаз розвитку у життєвому циклі), пов'язаних, перш за все, з дрібними розмірами цих тварин. Дослідження ґрунту є найбільш ефективним способом з метою виявлення та подальшої ізоляції ЕПН серед усіх інших альтернатив. Однак, методика відбору проб ґрунту з ЕПН у польових умовах потребує стандартизації. Метод біотестування (біопроб) із використанням тест-комах — личинок *Galleria mellonella* (або ж незрілих стадій інших видів комах) є найбільш результативним способом з метою ізоляції цільових ентомопатогенів, у порівнянні з широко використовуваним у нематології (для виділення червоподібних видів нематод) лійковим методом Бермана, використання якого вимагає від дослідника, в першу чергу, високого рівня знань морфології та таксономії нематод. Стосовно виділення різних стадій розвитку ЕПН із хазяїв — різноманітних комах, то метод пасок Уайта, який був розроблений для одержання інвазійних личинок майже століття тому, і дотепер є найрезультативнішим (залежно від мети досліджень, у поєднанні з методом гельмінтологічного розтину для отримання дорослих особин або без нього).

З огляду на значну морфологічну подібність ЕПН (особливо серед представників Steinernematidae) через відносно консервативні морфологічні ознаки, для точної ідентифікації видів рекомендується використовувати не тільки традиційні методи світлової/електронної мікроско-

пії, але й методи кросбридингу, а також молекулярно-генетичні методи. Незважаючи на те, що методи кросбридингу поряд з морфолого-морфометричними критеріями були найбільш часто використовуваними інструментами для ідентифікації ЕПН, у вітчизняній практиці, з невідомих причин, це повністю ігноровані методи, що можуть досить точно розмежувати морфологічно подібні види.

Молекулярно-генетичні методи нині вважаються найбільш оптимальними для видової ідентифікації та в цілому систематики ЕПН (Steinernematidae, Heterorhabditidae), однак досі залишаються мало використовуваними у вітчизняній науці в силу того, що вимагають наявності специфічного обладнання, високого рівня компетентності від дослідника тощо.

**Фінансування:** Дослідження проведено за рахунок бюджетної тематики Інституту захисту рослин НААН (Розробити превентивні та контролюючі протинематодні заходи в системі фітосанітарної безпеки), ДР № 0219U000300.

**Конфлікт інтересів:** автор декларує про відсутність конфлікту інтересів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Спиридонов С.Э. Энтомопаразитические и энтомопатогенные нематоды. В кн.: Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты; под ред. В.В. Глупова. Москва: Круглый год, 2001. С. 428-474.
2. Tarasco Eustachio, Fanelli Elena, Salvemini Carlo et al. Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria: from genes to field uses. *Frontiers in Insect Science*. 2023. Vol. 3. P. 1-13. Doi: 10.3389/finsc.2023.1195254
3. Спиридонов С.Э. Применение энтомопатогенных нематод в защите растений. Прикладная нематология; под ред. Н.Н. Буторина, С.В. Зиновьева, О.А. Кулинич и др.; Ин-т паразитологии РАН. Москва: Наука, 2006. С. 291-324.
4. Koppenhöfer Albrecht, Shapiro-Ilan, David Hiltbold, Ivan. Entomopathogenic nematodes in sustainable food production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2020. Vol. 4(125). P. 1-14. Doi: 10.3389/fsufs.2020.00125
5. Kasi Indra Kumar, Singh Mohinder, Banshtu Tanuja et al. Use of entomopathogenic nematodes for the management of insect pests of horticultural crops. *International Journal of Economic Plants*. 2022. Vol. 9(1) P. 006-013. Doi: 10.23910/2/2022.0421c

6. Sikandar A., Yuan R.H., Lian X.L., Zhen M.A., Zhao P., Li F., ... Wang Y.Y. Entomopathogenic nematodes as bioinsecticides — a review. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2021. Vol. 19(3). P. 2459-2476. Doi: 10.15666/AEER/1903\_24592476

7. Parwinder S. Grewal, Elizabeth A. B. de Nardo, Marineide M. Aguilera. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. *Neotrop. Entomol.* 2001. Vol. 30(2). P. 191-205. Doi: 10.1590/S1519-566X2001000200001

8. Lamovsek Janja, Gregor Urek, Stanislav Trdan. Biological Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.): Microbes against the Pests. *Acta agriculturae Slovenica*. 2013. Vol. 101(2). P. 263-275. Doi: 10.2478/acas-2013-0022

9. Milena Caccia, Paola Lax, Marcelo E. Doucet. Effect of entomopathogenic nematodes on the plant-parasitic nematode *Nacobus aberrans*. *Biology and fertility of soils*. 2013. Vol. 49 (1). P. 105-109. Doi:10.1007/s00374-012-0724-z

10. Mahfouz M.M. Abd-Elgawad, Hassan Abd-El-Khair, Faika F.H. Koura, Ahmed E. Abd El-Wahab, Sayed A. Montasser, Moustafa M.A. Hammam. Comparative effects of entomopathogenic nematodes and other biorational compounds on *Tylenchulus semipenetrans* Cobb populations on citrus. *Egypt. J. Agronomatol.* 2013. Vol. 12(1). P. 74-90.

11. Pantel L., Florin T., Dobosz-Bartoszek M., Racine E., Sarciaux M., Serri M., Houard J. ... Gualtieri M. Odilorhabdins, antibacterial agents that cause miscoding by binding at a new ribosomal site. *Molecular cell*. 2018. Vol. 70(1). P. 83-94. Doi: 10.1016/j.molcel.2018.03.001

12. Poinar G.O. Jr., Grewal P.S. History of entomopathogenic nematology. *Journal of Nematology*. 2012. Vol. 44 (2). P. 153-161.

13. Сигарева Д.Д., Никишичева Е.С. Биологические препараты на основе энтомопатогенных нематод как экологически безопасный способ регулирования численности вредных насекомых. *Вестник зоологии*. 2005. Вып. 19(2). С. 298-301.

14. Ед Люис, Херри Кайа, Стефановська Т.Р., Підліснюк В.В. Сучасний стан та перспективи застосування ентомопатогенних нематод. *Вісник Кременчуцького державного політехнічного університету імені Михайла Остроградського*. 2009. Вып. 4 (57). С. 141-153.

15. Дядечко М.П., Падай М.М., Шелестова В.С. та ін.; Біологічний захист рослин; за ред. М.П. Дядечко, М.М. Падея. Біла Церква, 2001. 312 с.

16. Sabbahi Rachid, Hock Virginia, Azaoui Khalil, Saoiabi Sanaa, Hammouti Belkheir. A global perspective of entomopathogens as microbial biocontrol agents of insect pests. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2022. Vol. 10(3). P. 1-15. Doi: 10.1016/j.jafr.2022.100376

17. Wall D. H., Nielsen U.N., Six J. Soil biodiversity and human health. *Nature*. 2015. Vol. 528. P. 69-76. Doi. org/10.1038/nature15744

18. Abd-Elgawad M.M.M. Optimizing entomopathogenic nematode genetics and applications for the integrated management of horticultural pests. *Horticulturae*. 2023. Vol. 9(8). P. 865-885. Doi: 10.3390/horticulturae9080865

19. Теленга Н.А. Биологический метод борьбы с вредными насекомыми сельскохозяйственных и лесных культур. Киев: Издательство академии наук Украинской ССР, 1955. 86 с.

20. Deka B., Baruah C., Babu A. Entomopathogenic microorganisms: their role in insect pest management. *Egyptian Journal of Biologi-*

cal Pest Control. 2021. Vol. 31 (1). P. 1–8. Doi: [org/10.1186/s41938-021-00466-7](https://doi.org/10.1186/s41938-021-00466-7)

21. Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Harasimiuk M. Występowanie oraz potencjał infekcyjny grzybow entomopatogenicznych w glebach z pol uprawnych, łąk i siedlisk leśnych. *Progress in Plant Protection*. 2016. Vol. 56 (1). P. 5–11. Doi: [10.14199/ppp-2016-001](https://doi.org/10.14199/ppp-2016-001)

22. Thais A Correa, Fernanda S Santos, Mariana G Camargo, Simone Quinelato, Vânia R. E. P. Bittencourt, Patricia S Golo. Comparison of methods for isolating entomopathogenic fungi from soil samples. *Journal of Visualized Experiments*. 2022 Vol. 6 (179). P. 1–10. Doi: [10.3791/63353](https://doi.org/10.3791/63353)

23. Dzięgielewska Magdalena, Adamska Iwona. Survey of entomopathogenic nematodes and fungi in agricultural areas. *Plant Protection Science*. 2020. Vol. 56. P. 214–225. Doi: [10.17221/7/2019-PPS](https://doi.org/10.17221/7/2019-PPS)

24. Puza V., Tarasco E. Interactions between entomopathogenic fungi and entomopathogenic nematodes. *Microorganisms*. 2023. Vol. 11 (163). P. 1–14. Doi: [10.3390/microorganisms11010163](https://doi.org/10.3390/microorganisms11010163)

25. Сігарьова Д.Д., Харченко В.В. Ентомопатогенні нематоди в агроценозах України та методи їх виявлення. *Карантин і захист рослин*. 2018. № 4-5 (248). С. 17–20.

26. Яковлев Є.Б., Харченко В.О. Методи вивчення ентомопатогенних нематод. *Вісник Київського національного університету ім. Т. Шевченка. Біологія*. 2015. Вип. 3 (68). С. 51–54.

27. Hunt David, Subbotin Sergei. Taxonomy and systematics 13–58. Edited by David J. Hunt and Khuong B. Nguyen (2016). «Preliminary Material». In *Advances in entomopathogenic nematode taxonomy and phylogeny*. Leiden, The Netherlands: Brill. doi: [https://doi.org/10.1163/9789004285347\\_001](https://doi.org/10.1163/9789004285347_001)

28. Стефановська Т.Р. Ефективність розмноження ентомопатогенних нематод *Steinernema carpocapsae* та *Heterorhabditis bacteriophora* на личинках *Galleria melonella* L. та *Tenebrio molitor* L. *Електронний журнал «Наукові доповіді НАУ»*. 2007. Вип. № 2(7).

29. Сігарьова Д.Д. Сільськогосподарська нематологія як розділ науки по захисту рослин. *Карантин і захист рослин*. 2012. № 8. С. 22–28.

30. Yakovlev Ye.B., Kharchenko V.A., Mraček Z. Findings of entomopathogenic nematodes (Rhabditida, Steinernematidae) in nature reserves in Ukraine. *Vestnik zoologii*, 2014. 48(3): 203–210.

31. Sigareva D., Kovtun A., Korniyushin V. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) from agricultural ecosystems in Forest (Polissya) and Forest-Steppe natural zones of Ukraine. *Vestnik Zoologii*. 2019. 53: 285–296. <https://doi.org/10.2478/vzoo-2019-0028>

32. Ковтун А.М. Нові знахідки локалітетів ентомопатогенних нематод родів *Steinernema* та *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) фауни України. *Карантин і захист рослин*. 2023. №2 (273). С. 39–45. <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2023.2.39-45>

33. Orozco R.A., Lee M.M., Stock S.P. Soil sampling and isolation of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Visualized Experiments*. 2014. Vol. 89. P. 1–8.

34. Tarasco E., Kary N.E., Fanelli E., et al.

Modified bait insect technique in entomopathogens' survey from the arasbaran biosphere reserve (Iran). *Redia*. 2020. 103, 129–132.

35. Дунаев Е.А. Методы эколого-энтомологических исследований. Москва: МосгорСЮН, 1997. 44 с.

36. Hazir Selcuk, Kaya Harry, Stock S. Patricia, Keskin Nevin. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*. 2003. Vol. 27. P. 181–202.

37. Arthurs Steve, Heinz K.M., Prasifka Jarrad. An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. *Bulletin of entomological research*. 2004. Vol. 94. P. 297–306. Doi: [10.1079/BER2003309](https://doi.org/10.1079/BER2003309)

38. Ковтун А.М. Особливості діагностики нематодозів комах, викликані ентомопатогенними нематодами з родин Steinernematidae та Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida). *Вирішення сучасних проблем у ветеринарній медицині: III Всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція*. Полтава, 15–16 лютого 2018 р.: тези доповіді. Полтава, 2018. С. 101–104.

39. Akhurst R., Bedding R.A., Bull R.M., Smith D.R. An epizootic of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda) in sugar cane scarabaeids (Coleoptera). *Fundamental & Applied Nematology*. 1992. 15 (1), 71–73.

40. Nielsen O., Philipson H. Danish surveys on insects naturally infected with entomopathogenic nematodes. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes*, IOBC/WPRS Bulletin. 2003. 26, 131–13.

41. Кирьянова Е.С., Пучкова Л.В. Новый паразит свекловичного долгоносика *Neoaplectana bothynoderi* Kirjanova et Putschkova, sp. n. (Nematodes). *Тр. зоол. ин-та АН СССР*. 1955. Т. 18. С. 53–62.

42. Сігарьова Д.Д., Пилипенко Л.А., Борзих О.І., Ковтун А.М. Сільськогосподарська нематологія. Київ: Аграрна наука, 2017. 340 с.

43. White G. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*. 1927. 66: 302–303.

44. Kurtulmuş, Ferhat, Tufan Can Ulu. Detection of dead entomopathogenic nematodes in microscope images using computer vision. *Bio-systems Engineering*. 2014. 118: 29–38.

45. Лазаревская С.Л. К методике изучения нематод насекомых. *Труды ГЕЛАН СССР*. 1962. № XII. С. 43–51.

46. McMullen JG, Stock SP. In vivo and in vitro rearing of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae). *J Vis Exp*. 2014 Sep 22;(91):52096. doi: [10.3791/52096](https://doi.org/10.3791/52096)

47. Kovtun A., Petrenko S. Frequency of occurrence and identification of nematodes among entomopathogenic organisms in agroecosystems of Ukraine. *GEO&BIO*. 2023. 24: 214–224.

48. Nguyen K.B. 2007. Methodology, morphology and identification, In : K. J. Nguyen and D. J. Hunt (Eds.). *Entomopathogenic nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. *Nematology Monographs and Perspectives* 5. Brill. Leiden-Boston. 59–119.

49. Nguyen K.B., Smart GC. Scanning electron microscope studies of *Steinernema anomali* Kozodoi, 1984. *J Nematol*. 1993. 25(3). P. 486–492.

50. Skrzypek, Henryk, Kazmierczak, Waldemar, Kreft, Anna. Scanning electron microscopy study of infective juveniles *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Annales UMCS, Biologia*. 2004. 59. P. 15–21.

51. Harry K. Kaya, S. Patricia Stock. Chapter VI - Techniques in insect nematology, Editor(s): Lawrence A. Lacey, *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Academic Press, 1997, P. 281–324. <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50016-6>

**Kovtun A.,**

ORCID: 0000-0002-6119-860X

*Odesa State Agrarian University, st. Panteleimonivska, 13, Odesa, 65012, Ukraine*

*e-mail: andrii\_kovtun@ukr.net*

### **Indication and identification of entomopathogenic nematodes Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae (a review)**

**Goal.** Of the study is to analyze the peculiarities of the use of methods aimed at detecting and identifying beneficial microorganisms for plant protection — entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). **Results.** A review of methods commonly used in faunistic studies of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) is given here, discussing their advantages and limitation. A single standard for many of the methods discussed in this review does not currently exist, so different approaches are described whose effectiveness has been confirmed experimentally and is considered satisfactory. First of all, the methods of soil sampling and insect hosts sampling and techniques for isolation of entomopathogenic nematodes from different types of samples are described. The most important systematic features of entomopathogenic nematodes, approaches to their identification and the main methods required for routine species identification, primarily the production of micro specimens and their examination by light microscopy, are discussed below. Methods of electron microscopy, cross-breeding and molecular genetic studies of entomopathogenic nematodes are also described. **Conclusions.** The obtained data are of significant theoretical and practical importance, as they allow for an informed choice of the most optimal method of detecting and identifying entomopathogenic nematodes — potential bioagents against insect pests.

**search and detection; isolation (identification); artificial infestation; biosecurity; insect pests**

**Надійшла до редакції: 16.10.2023**

**Прийнята до друку: 06.11.2023**

**Надруковано й опубліковано онлайн: грудень 2023**