

## PĀRSKATS

PAR MEŽA ATTĪSTĪBAS FONDA ATBALSTĪTO PĒTĪJUMU

<u>PĒTĪJUMA NOSAUKUMS:</u>	<b>NOZĪMĪGĀKO MEŽA KAITĒKĻU PATOĢĒNU INVENTARIZĀCIJA, IZPĒTE UN PERSPEKTĪVU NOVĒRTĒŠANA AUGU AIZSARDZĪBĀ</b>
----------------------------	--

LĪGUMA NR.: 300408/S124

IZPILDES LAIKS: 30.04.2008 – 03.11.2008

IZPILDĪTĀJS: Latvijas Valsts mežzinātnes institūts „Silava”

PROJEKTA VADĪTĀJS Dr. biol. Līga Jankevica

## **Izpildītāji**

1. Dr. biol. Līga Jankevica
2. Dr. biol. Ivars Zariņš
3. Dr. biol. Agnis Šmits
4. M. Sc. Rita Sešķēna
5. M. Sc. Jūlija Haļimona
6. B. Sc. Zane Striķe

## Kopsavilkums

Masveida kaitēkļu savairošanos dabā regulē to parazīti un patogēni. Liela nozīme ir slimību ierosinātājiem: entomopatogēnajiem vīrusiem, baktērijām un sēnēm. Priežu rūsganās zāglapsenes masu savairošanās Saules un Tērandes mežniecības teritorijās, radīja būtiskus zaudējumus. Iespējama arī priežu sprīžotāja savairošanās.

Mūsu darba mērķis bija kaitēkļiem patogēno mikroorganismu (vīrusu, sēņu un baktēriju) apzināšana mērķtiecīgai populācijā un ekosistēmā akumulēto patogēnu izmantošanai, kā arī virulentu patogēnu celmu iegūšana un genofonda izveidošana. Empīriskais materiāls tika ievākts 6 objektos: 4 priežu audzēs Kurzemes reģionā un 2 priežu audzēs Vidzemes reģionā. Patogēnu sastopamības novērtēšanai pielietojām novērošanas un mikroskopijas metodes. Mikrofloras raksturošanai un izdalīšanai tika izmantota atšķaidījuma metode. Vīrusu infekcijas aktivizēšanai tika pielietoti stresa faktori. Vīrusbrīvu populāciju identifikācijai tika lietota L. Jankevičicas optimizēta metode.

Izvērtējot patogēnu sastopamību rūsganās zāglapsenes populācijās, secinājām, ka visos parauglaukumos sastopams kodolu poliedrozes vīruss (KPV). KPV aktīvā formā izraisa kāpuru mirstību Engurē –  $28,3 \pm 3,4\%$ , Ancē –  $25,0 \pm 2,8\%$ , Padurē -  $9,7 \pm 1,2\%$ . Valkā un Ventā KPV atrodas persistentā formā, ko var aktivizēt pielietojot stresa faktoros. Savukārt apsekotajās priežu sprīžotāja populācijās KPV aktīvā formā sastopams Engurē – tipiska mirstība  $5,0 \pm 2,2\%$ , Valkā un Ancē -  $2,5 \pm 2,0\%$ , savukārt persistentā formā Ventā un Padurē. Analizējot kāpuru mikrofloru noskaidrots, ka baktēriju kopskaits dažādu sugu kāpuros būtiski atšķiras ( $P < 0,05$ ),  $(5,0 \pm 1,6) \times 10^3$  sprīžotāja kāpuros,  $(3,1 \pm 0,9) \times 10^4$  rūsgano zāglapsēņu kāpuros, attiecīgi,  $(2,7 \pm 0,8) \times 10^6$  un  $(3,0 \pm 0,1) \times 10^6$  priežu pūcītes un ozolu mūķenes kāpuros. No kaitēkļiem izdalīti patogēni un nosacīti patogēni mikroorganismi. Kodolu poliedrozes vīrusi izdalīti no 4 kaitēkļu sugām. No *N. sertifer* izdalītas 15 vizuāli atšķirīgas baktēriju sugas, kas pieder pie 10 ģintīm un 7 mikroskopiskās sēnes no 6 ģintīm. No *B. piniarius* izdalītas 14 baktērijas un 9 mikroskopiskās sēnes no 6 ģintīm. Turpmāk nepieciešams veikt eksperimentus izvērtējot jauno izolātu patogenitāti.

Pielietojot stresa faktoros izdevies aktivizēt poliedrozes tipa vīrusu priežu rūsganās zāglapsenes, priežu zāglapsenes, iedzeltenās priežu zāglapsenes un priežu sprīžmeša kāpuros. Vislabākie rezultāti iegūti, kā stresa faktoros izmantojot ekstrēmas temperatūras maiņas (priežu rūsganās zāglapsenes mirstība  $77,3 \pm 4,9\%$ , sprīžotāja -  $96,9 \pm 6,0\%$ ). Lauka eksperimentos pierādīts, ka Ns KPV preparāti ir efektīvi rūsganās priežu zāglapsenes ierobežotāji. Ns KPV 1993. gada izolāta preparatīvās formas, 15 dienas pēc apmiglošanas, izraisa kāpuru mirstību  $81,9 \pm 4,0\%$  un  $89,8 \pm 3,6\%$ . Savukārt *B. thuringiensis* suspensijas efektivitāte  $44,4 \pm 7,1\%$ . Paralēli pētījumiem uzsākām *N. sertifer*, *B. piniarius* un *L. dispar* savairošanu un laboratorijas kultūru

izveidošanu, iegūti *N. sertifer* un *L. dispar* dējumi. Vīrusu latentās un persistentās infekcijas pierādīšanai sekmīgi pielietojām molekulāros marķierus un laboratorijā optimizētu selektīvu metodi.

## Saturs

<b>Saturs</b> .....	5
<b>1. Ievads</b> .....	6
<b>2. Literatūras apskats</b> .....	8
<b>3. Materiāls un metodika</b> .....	10
3.1. Parauglaukumu apraksti .....	10
3.2. Entomoloģiskā materiāla ievākšanas metodes un populāciju blīvuma noteikšana .....	12
3.3. Patogēnu sastopamības noteikšana zāģlapseņu, ozolu mūķenes un priežu sprīžotāja populācijās .....	13
3.4. Mikroorganismu izdalīšanas un savairošanas metodika .....	14
3.5. Kukaiņu audzēšana .....	15
3.6. Stresa faktoru lietošana vīrusu infekcijas aktivizēšanai .....	16
3.7. Lauka eksperimenti .....	16
3.8. Vīrusbrīvu populāciju diagnostika .....	17
3.9. Statistiskā analīze .....	18
<b>4. Rezultāti un diskusija</b> .....	19
4.1. Kaitēkļa <i>B. piniarius</i> populāciju blīvuma uzskaites parauglaukumos .....	19
4.2. Patogēnu sastopamība apsekotajās kaitēkļu populācijās .....	20
4.3. Entomopatogēno mikroorganismu izdalīšana no kaitēkļu kāpuriem un kūniņām .....	24
4.4. Stresa faktoru lietošana vīrusu infekcijas aktivizēšanai .....	29
4.5. Lauka eksperimenti un pielietošanas augu aizsardzībā izvērtēšana .....	31
4.6. Vīrusbrīvas kaitēkļu laboratorijas kultūras izveidošana .....	33
4.7. Vīrusbrīvu populāciju diagnostika, izmantojot molekulāros marķierus .....	35
4.8. Zinātniskas publikācijas sagatavošana .....	35
<b>Secinājumi</b> .....	36
<b>Literatūra</b> .....	38

## 1. Ievads

Kaitēkļu savairošanās pēdējos gados rada būtiskus zaudējumus mežsaimniecībai, piemēram, priežu rūsganās zāglapsenes masu savairošanās Saules mežniecības (Valkas VVM) un Tērandes mežniecības (Ventspils VVM) teritorijās. Iespējama arī priežu sprīžotāja savairošanās. Masveida kaitēkļu savairošanos dabā regulē to parazīti un patogēni. Liela nozīme ir slimību ierosinātājiem: entomopatogēnajiem vīrusiem [1], baktērijām un sēnēm [2]. Augu aizsardzībā cīņā ar kaitēkļiem mūsdienās vēl joprojām lieto dažādus ķīmiskus savienojumus – insekticīdus, kuri nodrošina ātru un efektīvu rezultātu. Tajā pašā laikā tie ievērojami piesārņo apkārtējo vidi – augsni, ūdens resursus u.c. Ķīmiskas izcelsmes pesticīdu intensīva izmantošana nav vēlama Latvijas klimatiskajos apstākļos, kuri raksturojas ar salīdzinoši zemu saules intensitāti, kas paildzina ķīmisko savienojumu noārdīšanās periodu dabā. Ņemot vērā iepriekš minēto, šodien ļoti aktuāli ir izstrādāt un ieviest praksē jaunus ekoloģiski nekaitīgus, pietiekami efektīvus un ekonomiski rentablus augu aizsardzības līdzekļus.

Pasaulē mikroorganismi un bakulovīrusi tiek sekmīgi izmantoti augu aizsardzībā. Nozīmīgākais mikrobioloģiskās izcelsmes produkts ir entomopatogēnā baktērija *Bacillus thuringiensis* (Bt). Pasaules Veselības organizācija secināja, ka specifiskās iedarbības rezultātā Bt produkti nerada nelabvēlīgu ietekmi cilvēkam, citiem mugurkaulniekiem un vairumam ne mērķa bezmugurkaulnieku. A. Šmits novēroja kodola poliedrozes vīrusa infekciju priežu rūsganās zāglapsenes populācijās, kas 2005. gadā tika apmiglota ar Dimelin 80 WG. Mikroorganismu introducēšana biocenozē tikai papildina un intensificē dabā notiekošos procesus, tādēļ tos iespējams izmantot profilaktiskai augu aizsardzībai. Droša un efektīva mikroorganismu pielietošana bioloģiskajā kontrolē pieprasa padziļinātas zināšanas par patogēnu ekoloģiju [3]. Lai noskaidrotu to potenciālu meža kaitēkļu populāciju regulēšanā, nepieciešamas zināšanas par mijiedarbību starp patogēniem, to saimniekiem, veģetāciju un augsni.

Meža ilgtspējīgai attīstībai nepieciešami ekoloģiski nekaitīgi kaitēkļu populāciju savairošanos ierobežojoši līdzekļi, lai samazinātu nepieciešamību pielietot ķīmiskos augu aizsardzības līdzekļus un novērstu kaitīgo iedarbību uz bioloģisko daudzveidību.

Projekta mērķi:

Funkcionālas bioloģiskās daudzveidības – kaitēkļiem patogēno mikroorganismu (vīrusu, sēņu un baktēriju) – apzināšana mērķtiecīgai populācijā un ekosistēmā akumulēto patogēnu izmantošanai, un virulentu patogēnu celmu iegūšana un genofonda izveidošana.

Projekta mērķu sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši darba uzdevumi:

1. Izpētīt patogēnu sastopamību zāglapsēņu un priežu sprīžotāja populācijās Ventpils, Kuldīgas un Madonas rajonos iekārtotajos 6 parauglaukumos.
2. Entomopatogēnās mikrofloras (baktēriju, sēņu) izdalīšana no kaitēkļu (*N. sertifer*, *B. piniarius* u.c.) kāpuriem un kūniņām.
3. Stresa faktoru (termisko, fizioloģisko, mehānisko u.c.) lietošana vīrusu infekcijas aktivizēšanai.
4. Lauka eksperimenti, veicot zāglapsenes kāpuru apmiglošanu ar kodolu poliedrozes vīrusu un baktēriju *B. thuringiensis*, un perspektīvu augu aizsardzībā izvērtēšana.
5. Iegādāties veģetācijas kameru un uzsākt vīrusbrīvas kaitēkļu kultūras uzturēšanu.
6. Vīrusbrīvu populāciju diagnostika, izmantojot molekulāros marķierus.
7. Vienas zinātniskas publikācijas sagatavošana.

## 2. Literatūras apskats

Pasaulē zināmi vairāk kā 4000 mikroorganismu, kas izraisa augu kaitēkļu saslimšanu un regulē kaitēkļu savairošanos dabā. Atsevišķi kukaiņiem patogēnie mikroorganismi tiek sekmīgi izmantoti augu aizsardzībā. Pieaugot prasībām pēc vides daudzveidības saglabāšanas un aizsargāšanas no tālākas ķīmiskās piesārņošanas, pasaulē pievērš lielu uzmanību ekoloģiski nekaitīgu un ekonomiski rentablu augu aizsardzības līdzekļu izstrādāšanai, ar tiem maksimāli aizstājot ķīmiskos insekticīdus. Šie līdzekļi nav orientēti uz totālu kaitēkļu iznīcināšanu ekosistēmā, bet gan uz to savairošanās ierobežošanu zem kritiskā kaitīguma sliekšņa, tādējādi nodrošinot pietiekamu augu aizsardzību un sugu daudzveidības saglabāšanos. Pieaugot prasībām vides aizsardzībā un saglabāšanā visā pasaulē, Eiropas Savienībā izstrādātas prasības augu aizsardzības līdzekļiem [4].

Entomopatogēno mikroorganismu preparātus mūsdienās uzskata par videi draudzīgiem bioinsekticīdiem un perspektīviem integrētajā kaitēkļu apkarošanas sistēmā. Kukaiņu patogēni, to izraisītās epizootijas (kaitēkļu masveida saslimšana) un to pielietošana plaši tiek pētīta ASV, Kanādā, Anglijā, Zviedrijā, Vācijā, Francijā un Ķīnā [2, 5, 6, 7]. Pētnieki norāda, ka ģeogrāfiski attālām kaitēkļu populācijām var būt atšķirīgi entomopatogēni un to iedarbības efektivitāte, ko nosaka kaitēkļa vietējās rases specifika, imūnās īpašības, barības auga tips, mikroklimatiskie apstākļi u.c. faktori. Vīrusu preparāti ir pietiekami efektīvi kā bioloģiskie insekticīdi, un to ieguve un pielietošana parasti ir rentabla [8, 9, 10, 11]. Kā piemēru var minēt *Gilpinia hercyniae* kodolu poliedrozes vīrusu, kas ir ilglaicīgs kaitēkļu populāciju regulētājs un sekmīgi tiek pielietots Kanādā [5, 8]. Eiropas Savienības valstīs kā bioinsekticīdi atbilstoši EEC direktīvai 91/414 reģistrēti arī vairāki sēņu *Beauveria bassiana*, *Metharizium anisopliae*, *Paecilomyces fumorosum* un *Verticillium lecanii* celmi [12]. Vairums patogēno mikroorganismu, ko šobrīd izmanto bioloģiskajā kontrolē, ir izdalīti no epidēmiskām kukaiņu populācijām [2, 11, 13]. Mikroorganismiem kā bioloģiskās augu aizsardzības līdzekļiem ir sekojošas priekšrocības: 1) tie ir specifiski noteiktām kukaiņu sugām, līdz ar to nav nelabvēlīgas ietekmes uz augiem, zivīm, putniem, siltasiņu dzīvniekiem, cilvēku un pārējo entomofaunu [14]; 2) iedarbojas visās kaitēkļu attīstības stadijās; 3) izplatās biocenozēs un pašreproducējas kaitēkļu populācijās, limitējot kaitēkļu skaitu vairākus gadus pēc iniciējošās preparātu pielietošanas [15, 16]; 4) vietējie celmi ir efektīvi konkrētajos klimatiskajos apstākļos [11]. Lai izveidotu mikrobioloģiskos preparātus, vispirms jāatrod un no kaitēkļiem jāizolē patogēni, jāveic to savairošana mākslīgos apstākļos, jāizveido augsti virulenti celmi, jānosaka to aktivitāte visās kukaiņu attīstības stadijās, jāprecizē



to iedarbības laiks un infekciju ietekmējošie sinerģiskie faktori, jāizveido preparatīvās formas ar labām tehniskām īpašībām.

Bioloģisko augu aizsardzības paņēmieni pielietošana parasti nodrošina kaitīgo organismu savairošanās intensitātes ierobežošanu zem kritiskā sliekšņa, tādējādi būtiski neapdraudot kokaugu normālu augšanu un attīstību, saglabājot ekoloģisko līdzsvaru dabā. Līdz šodienai entomopatogēnu ekoloģija ir relatīvi maz pētīta, nav pietiekamas informācijas par patogēnu ekoloģisko un fizioloģisko saimnieku rindu [17]. Molekulārie un teorētiskie atklājumi un uz tiem balstītās metodes tiek pielietotas kā “ekoloģiski resursi”, lai izpētītu saimniekkukaiņu un patogēnu mijiedarbības aspektus. Pasaulē mikroorganismu diagnostikā strauji palielinās polimerāzes ķēdes reakcijas pielietošana (PCR), kas balstās uz DNS fragmentu multiplikāciju *in vitro*. Molekulārie atklājumi un uz tiem balstītās metodes tiek pielietotas patogēnu sastopamības un izplatības pētījumos [18, 19].

Meža kaitēkļu *Neodiprion sertifer* populācijās atrasti dažādi patogēni, visbiežāk sastopamais ir kodolu poliedrozes vīruss [20], bez tam no populācijām izdalītas arī *Bacillus* ģints sporu veidojošās baktērijas un patogēnās sēnes *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* [21, 22]. No citu sugu zāglapsenēm izdalītas baktērijas - *Streptococcus sp.* un *Enterobacter cloacae* un sēnes - *Trichothecium roseum*, *Paecilomyces farinosus*, *Fusarium sp.*, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus parasiticus* un *Entomophaga tenthredinis* [21, 22]. DNS un RNS vīrusi izdalīti no priežu sprīžotāju kāpuriem.

Latvijā entomopatogēno vīrusu izraisīta saslimšana novērota tikai 17 kukaiņu sugām [23, 24, 25], entomopatogēno sēņu izraisīta saslimšana konstatēta 20 laputu sugām, vairākām mušu un vaboļu sugām [26]. Pagājušā gadsimta 80. - 90. gados *Neodiprion sertifer* apkarošanā Kurzemes mežniecībās sekmīgi tika pielietotas institūtā izveidotās *Neodiprion sertifer* kodolu poliedrozes vīrusu preparatīvās formas [27]. 1994. gadā LU Bioloģijas institūtā tika izveidota “Augu kaitēkļu daudzumu limitējošo bioaģentu kolekcija”, kurā tiek saglabāti dabā atrastie un izdalītie patogēni, kā arī selekcijas ceļā iegūtie mikroorganismu celmi. Tīrkultūrās izdalīti vairāk kā 50 patogēnu izolāti, aprakstītas to morfoloģiskās un bioloģiskās īpašības.

### 3. Materiāls un metodika

#### 3.1. Parauglaukumu apraksti

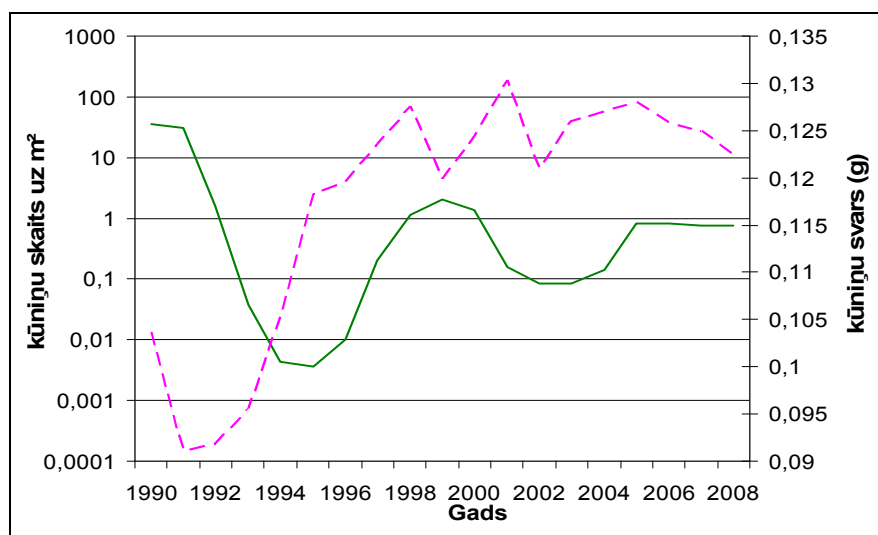
Izpētei nepieciešamais entomoloģiskais materiāls tika ievākts 6 parauglaukumos. Četri parauglaukumi izvietoti Kurzemē priežu sprīžotāja primārās vai sekundārās savairošanās ligzdu skartās audzēs. Divi parauglaukumi izvietoti Vidzemē - viens parauglaukums izvietots netālu no Meža pētīšanas stacijas „Kalsnava”, kur šo kaitēkļu masu savairošanās nav novērota, otrs Valkas mežniecībā. Četros no izvēlētajiem parauglaukumiem (Venta, Padure, Ance un Kalsnava), kopš 1990. gada veiktas zemsedzes kontroles ar mērķi noteikt priežu sprīžotāja blīvuma izmaiņas pa gadiem. Engures un Valkas parauglaukumi iekārtoti priežu rūsganās zāglapsenes radīto bojājumu uzskaitēi. Parauglaukumu vispārīgs raksturojums un aptuvenās ģeogrāfiskās koordinātes dotas 1.tabulā.

1.tabula

Parauglaukumu novietojums un vispārīgs raksturojums

Parauglaukums	Ģeogr. koordinātes		AAT	Audzes sastāvs un vecums
	X	Y		
Venta	57°9'2"	21°40'58"	Mr	10P91
Padure	57°3'59"	21°47'56.7"	Mr	9P84 1P69
Ance	57°34'51.4"	22°11'57.5"	Sl	7P86 3P106
Engure	57°9'58"	23°00'20"	Sl	10P86
Kalsnava	56°41'6.5"	25°54'39.1"	Mr	10P56
Valka	57°38'27"	25°52'24"	Mr	10P91

Priežu sprīžotāja populācijai Kurzemes parauglaukumos 2004. un 2005.gados bija novērojams straujš pieaugums (1.att.), tomēr turpmākajos gados populācijas pieaugums netika novērots un šajā ciklā populācijas maksimumā kūniņu blīvums zemsegā nepārsniedza 1 kūniņu uz kvadrātmetru. Sprīžotāja kūniņu svars un, sekojoši, potenciālā auglība saglabājas augstā līmenī (1.att).



1.attēls. Priežu sprīžotāja kūniņu blīvuma zemsedzē un mātīšu kūniņu svara izmaiņas kopš 1990.gada (vidējās vērtības no 6 stacionāriem parauglaukumiem).

Priežu rūsganās zāglapsenes populācijas 2008. gadā atradās depresijas fāzē. Zāglapseni, kas galvenokārt savairojas jaunaudzēs, ievācām parauglaukumiem pieguļošajās jaunaudzēs. Bez tam netālu no Ances parauglaukuma Dundagas mežniecības teritorijā tika konstatēta masveida priežu rūsganās zāglapsenes savairošanās (2. att.). Populācijas blīvums bija ļoti liels - 0,5 ha tika ievākti 18 000 kāpuri, kuri tika izmantoti kodolu poliedrozes vīrusa aktivitātes pārbaudēm un vīrusa materiāla savairošanai.



2. attēls. Jaunaudze netālu no Ances parauglaukuma (Dundagas mežniecība), kur 2008. gadā savairojusies priežu rūsganā zāglapsene.

Šogad pirmo reizi Latvijā tika novērota ozolu mūķenes *Lymantria dispar* masveida savairošanās. Kāpuri un kūniņas tika ievākti Liepājas ezera apkārtnē netālu no Liepājas slimnīcas.

### 3.2. Entomoloģiskā materiāla ievākšanas metodes un populāciju blīvuma noteikšana

Entomoloģiskā materiāla ievākšanai tika izmantotas standarta metodikas:

- kaitēkļu *Neodiprion sertifer* un *Bupalus piniarius* kāpuru ievākšana dažādos Latvijas rajonos, izmantojot nopurināšanas metodi uz uztvērējiem vairogiem. Šim mērķim tika izmantota agroplēve (3 x 5 m), ko novietoja uz zemsedzes zem koka vainaga (3. att.);
- kūniņu ievākšana, veicot zemsedzes analīzi, apsekojot 1 m<sup>2</sup> lielus parauglaukumus (4. att.);
- oliņu ievākšana, vizuāli apsekojot parauglaukumus un citas teritorijas.



3. attēls. Priežu sprīžotāja kāpuru ievākšana ar vairoga metodi.

Kaitēkļu populāciju blīvumu noteikšanai tika pielietota zemsedzes analīze (*B. piniarius*, *N. sertifer*) un priežu atskujojuma pakāpes jeb defoliācijas novērtējums un/vai kaitēkļu dējumu/ligzdu uzskaitē parauglaukumos.



4. attēls. Priežu rūsganās zāglapsenes kūniņu ievākšana.

### 3.3. Patogēnu sastopamības noteikšana zāglapsēņu, ozolu mūķenes un priežu sprīžotāja populācijās

Patogēnu sastopamības pētījumiem izvēlētajos parauglaukumos tika ievākti kaitēkļu (*N. sertifer*, *D. pini* un *B. piniarius*) kāpuri. *Lymantria dispar* kāpuri un kūniņas tika ievākti Liepājas apkārtnē, kur šogad tika konstatēta masveida savairošanās. Sastopamības novērtēšanai izmantojam vairākas metodes:

Novērošanas metode: Pēc ievākšanas kāpuri tika ievietoti speciālos izolatoros novērošanai. Novērošanai izvēlēto kāpuru skaits no populācijas blīvuma. Kaitēkļu barībai tika izmantoti ar UV lampu debakterizēti barības augu zari. Pēc nepieciešamības tika ievietoti papildus barības augi. Kaitēkļu mirstības uzskaites tika veiktas ik pēc 2 dienām. Mirstības iemesli tika novērtēti, veicot mirušo kaitēkļu uztriepju izmeklēšanu ar gaismas un/vai tumšā lauka mikroskopu Olympus CX 41, un standarta metodes [28, 29]. Rezultāti izteikti %.

Mikroskopēšanas metode: Ar raksturīgām saslimšanas pazīmēm ievāktos kaitēkļu hemolimfas uztriepju un viduszarnas preparātu mikroskopija, pielietojot gaismas un/vai tumšā lauka mikroskopu un standarta metodes [28, 29].

Izsēšanas metode:

Kaitēkļu preparēšana un izsējumu pagatavošana:

Katrā parauglaukumā ievāc 10 – 20 kāpurus. Kāpuru izņem no izolatora, saspiež tā galvas daļu un uz sekundi iemērc etilspirtā, un aizdedzina, pēc 2 sekundēm liesmu nodzēš [29]. Kāpuru ievieto sterilā Petri traukā un ar sterilu skalpeli atdala galvu no pārējā ķermeņa. Ar

sterilu preparējamo adatu piespiež vēdera viena gala ārējo apvalku pie cietas pamatnes un, izmantojot sterilu pinceti, izvelk zarnu. Zarnu un tās saturu pārnes Eendorfa mēģenē un tam klāt pielej 1 ml sterila ūdens. Ar preparējamo adatu un/vai sterilu stikla irbulīti saturu homogenizē. Mikroorganismu skaita noteikšanai pēc vispār pieņemtās metodikas pagatavo zarnu suspensijas decimālatšķaidījumus no 1 līdz 1:1000. Uz barojošā agara uzsēj 1 ml no katras pagatavotās atšķaidījuma pakāpes, uz modificētās iesala ekstrakta barotnes uzsēj 0.1 ml no 1 atšķaidījuma.

Barojošā agara barotne (baktērijām): gaļas ekstrakts 1,5g; gaļas peptons – 5g; rauga ekstrakts – 1,5 g; NaCl – 5g; agars – 15g, ūdens 1l. Modificētā iesala agara barotne (sēnēm): iesala ekstrakts (d=1,028); peptons - 1 g/l; agars - 20g/l.

Kultivē inkubatorā 30 ±2 °C; baktēriju kolonijas uzskaita 4. dienā; sēņu kolonijas uzskaita 10. dienā. Rezultātus izsaka koloniju veidojošās vienības (kvv) uz 1 kāpuru. Morfoloģiski atšķirīgās baktēriju un sēņu kolonijas izdala tīrkultūrās un identificē.

### **3.4. Mikroorganismu izdalīšanas un savairošanas metodika**

#### Bakulovīrusu sakoncentrēšana, izdalīšana un uzglabāšana

Vīrusinficētie kāpuri tika ievietoti stikla pudelē, aplieti ar atbilstošu tilpumu sterila ūdens (pārsedz visus kāpurus), kam pievienota antibiotika Penicilīns G (12 ng/ml). Uzglabāti ledusskapī 6 ± 2 °C vienu līdz divus mēnešus. Pēc macerēšanas kāpuri tika homogenizēti, filtrēti un centrifugēti. Vīrusu attīrīšana veikta saskaņā ar standartmetodikām [30, 31]. Iegūto attīrīto vīrusu uzglabā šķidrā formā, sedimentu suspendējot 40 % glicerīna suspensijā (attiecībā 1: 6), ievieto cieši noslēgtā traukā.

#### Entomopatogēno baktēriju izdalīšana, identificēšana, savairošana un uzglabāšana

Entomopatogēno baktēriju izdalīšanai un pārsēšanai tīrkultūrās izmanto barojošā agara barotni (Lab M). Baktēriju tīrkultūras tika pārsētas mēģenēs ar Barības agaru un pārlietas ar sterilu vazelīna eļļu, uzglabātas ledusskapī 6 ± 2 °C temperatūrā. Baktēriju tīrkultūras pārsēj ne retāk kā 1 x 3 mēnešos.

Baktēriju identifikācija. Morfoloģiskās atšķirības nosaka pēc koloniju morfoloģijas un mikroskopējot pēc šūnu formas, lieluma un kustīguma. Veic nepieciešamās identifikācijas reakcijas: krāsošana pēc Grama (Gram stain Pak, BBL), oksidāzes tests (Oxidase reagent droper, BBL) un indola tests (Kovac's reagent, BioLife), rīkojas saskaņā ar ražotāju instrukcijām. Gram negatīvo baktēriju sistemātisko piederību nosaka, izmantojot Crystal E/NF identifikācijas sistēmu (BBL Crystal Enteric/ NF ID), testam izmanto baktēriju tīrkultūras, kas nav vecākas par 24 h. Gram pozitīvo baktēriju sistemātisko piederību nosaka, izmantojot Crystal GP identifikācijas sistēmu (BBL Crystal Gram + ID) [32].

*Bacillus thuringiensis* baktēriju savairošanai un sporu materiāla iegūšanai izmanto LB šķidro barotni (Difco): triptons 10 g/l, rauga ekstrakts 5 g/l, NaCl 10g/l [33].

#### Entomopatogēno sēņu izdalīšana, identifikācija, savairošana un uzglabāšana

Entomopatogēno sēņu tīrkultūras pēc izdalīšanas tika pārsētas mēģenēs ar modificētu misas agara barotni, uzglabātas ledusskapī  $6 \pm 2$  °C temperatūrā. Tīrkultūras pārsēj ne retāk kā 1 x 6 mēnešos. Izdalītās sēņu kultūras identificē, izmantojot mikroskopu Olympus CX 41 (palielinājums 200 – 400 reizes) un noteicējus [ 34; 35; 36; 37].

### **3.5. Kukaiņu audzēšana**

Kukaiņus laboratorijas apstākļos audzēja insektārijos vai stikla cilindros, kas noslēgti ar kaprona sietu (4. attēls), optimālos to attīstībai mikroklimatiskajos apstākļos: diennakts apgaismojums - 16 stundas, apgaismojuma intensitāte - 800 - 1000 luksu; temperatūra - 20 – 22 °C, relatīvais gaisa mitrums - 75 - 85%. Barībai izmantoja tiem piemērotus svaigus barības augus. Kāpuru pārvietošanai un to blīvuma regulācijai izmantoja pozitīvo gaismas reakciju. Kūniņu uztveršanai izgatavoja mākslīgu zemsedzi ar optimālu mitruma režīmu. Kūniņas ataudzēja klimata kamerā, kurā tika imitēti laika apstākļi dabā. Imago audzēja 20 – 30 eksemplārus vienā izolatorā ar dzimumu attiecību 1: 1. Kā substrātu olu dēšanai izmantoja filtrpapīru ar ”ermoņikas” formu vai augu zarus.



4. attēls. Priežu kaitēkļu kāpuru audzēšana laboratorijā.

### 3.6. Stresa faktoru lietošana vīrusu infekcijas aktivizēšanai

N. sertifer persistentās vīrusu infekcijas aktivizēšanai tika pielietoti sekojoši stresa faktori:

1) kāpuru (III vecums) inficēšana ar radnieciskiem vīrusiem – *Malacosoma neustria* KPV  $1 \times 10^8$  pol/ml; 2) kāpuru izturēšana pazeminātā un paaugstinātā temperatūras režīmā (24h + 4 °C, sekojoši 48 h + 35°C); 3) barības augu apstrāde ar ķīmiskiem savienojumiem 0,5% CuSO<sub>4</sub> un 1% borskābi; 4) kāpuru barošana ar netipisku barību - *Pinus strobus* skujām.

B. piniarius persistentās vīrusu infekcijas aktivizēšanai tika pielietoti sekojoši faktori:

1) kāpuru (III vecums) inficēšana ar radnieciskiem vīrusiem – *N. sertifer* kodolu poliedrozes vīrusu (Ns KPV)  $1 \times 10^8$  pol/ml; 2) kāpuru izturēšana pazeminātā un paaugstinātā temperatūras režīmā (24h + 4 °C, sekojoši 48 h + 35°C); 3) barības augu apstrāde ar ķīmiskiem savienojumiem - 0,5% CuSO<sub>4</sub>; 4) kāpuru barošana ar netipisku barību - iesausinātām skujām.

Diprion pini persistentās vīrusu infekcijas aktivizēšanai tika pielietoti sekojoši faktori:

1) kāpuru (II vecums) inficēšana ar radnieciskiem vīrusiem – Ns KPV  $1 \times 10^8$  pol/ml; 2) barības augu apstrāde ar ķīmiskiem savienojumiem 0,5% CuSO<sub>4</sub> [38].

Laboratorijas eksperimentiem tika izmantotas speciālas kameras ar konstantiem apstākļiem, diennakts apgaismojums - 16 stundas, apgaismojuma intensitāte - 800 - 1000 luks; temperatūra 20 – 22 °C, relatīvais gaisa mitrums - 75 - 85%. Mirstības kontroli uzsāka 5 dienā un turpmāk veica katru otro dienu. Eksperimenti tika iekārtoti 4 - 5 atkārtojumos. Vīrusa infekcijas apstiprināšanai veikta mirušo kāpuru mikroskopēšana gaismas mikroskopā un tumšā lauka mikroskopā. Elektronmikroskopiskie ultra strukturālie izmeklējumi sadarbībā ar LU Bioloģijas institūta un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra zinātniekiem, veikti pielietojot elektron-mikroskopijas standartmetodikas.

### 3.7. Lauka eksperimenti

Lauka eksperimentos pārbaudījām *Bacillus thuringiensis* izolāts (2005. g.) un divu Ns KPV izolātu efektivitāti: 1) 2008. g. izolāts izdalīts no Engurē ievāktiem vīrus inficētiem kāpuriem; 2) 1993. gada izolāts uzglabāts 15. gadus trīs dažādās formās: 1) sausā forma, uzglabāts saldētavā (I); 2) šķidrā forma uzglabāts ūdens - glicerīna suspensijā, uzglabāts ledusskapī (II); šķidrā forma ar pildvielām selīts un PVA-M, uzglabāts ledusskapī (III). Lauka apstākļos tika apmiglota 15 gadus vecas augošanas priedes (*Pinus sylvestris* L.), kuru zari pirms tam tika infestēti ar 100 *N. sertifer* III vecuma kāpuriem (ievākti Valkas un Dundagas mežniecībās). Infestētie un apmiglotie zari tika norobežoti ar kaprona sieta izolatoriem. Eksperimenti tika iekārtoti 5 atkārtojumos.



Miglošanai tika izmantots miglotājs (Yamar-10), sprausla 1.6 mm, miglošanas leņķis - 50°, šķidruma izlietojums - 1 l/min, deva - 50 litri/ha.

Izmantotās darba suspensijas: Ns NPV suspensija ar darba koncentrāciju  $1 \times 10^7$  poliedri/ml; *B. thuringiensis* suspensijas ar darba koncentrāciju  $5 \times 10^5$  un  $1 \times 10^8$  sporas/ml. Kontrole tika miglota ar ūdeni. Vīrusu/baktēriju daudzums darba suspensijā, ko izmantoja miglošanai, tika noteikts, izmantojot hemo-citometru un gaismas mikroskopu [30, 39].

Metroloģiskie apstākļi lauka izmēģinājumu laikā no 19.06.2008. – 30.06.2008. - vidējā diennakts temperatūra bija +14°C, minimālā temperatūra +2°C, maksimālā temperatūra +23°C; laika no 1.07.2008. - 13.07.2008 - vidējā diennakts temperatūra bija +15°C, minimālā temperatūra +5°C, maksimālā temperatūra + 25°C, relatīvais gaisa mitrums bija 80 - 86 %.

Mirstības kontroli uzsāka 5 dienā un turpmāk veica katru otro dienu. Efektivitāti izsaka koriģētās mirstības procentos.

### **3.8. Vīrusbrīvu populāciju diagnostika**

#### Vīrusu un kukaiņa genomiskās DNS izdalīšana

Katru kāpuru, kūniņu vai imago atsevišķi homogenizē 600 µl ledus aukstā TE bufera, kam pievienots 0.1% SDS. Genomiskās DNS izdalīšanai izmanto Genomic DNA Purification Kit (MBI Fermentas) ievērojot ražotāja instrukciju.

#### KPV noteikšana, pielietojot PCR, izmantojot LU Bioloģijas institūtā optimizētu selektīvu metodi

Poliedrozes vīrusu DNS noteikšanai *N. sertifer* un *B. piniarius* kāpuru un kūniņu ekstraktos pielietota selektīva metode, kas balstās uz poliedrīn-specifiskas DNS amplifikāciju ar polimerāzes ķēdes reakciju (PCR). PCR reakcijas maisījums satur sekojošus komponentus: patogēna DNS - 1µl; 10X *Taq* buferis ar KCl - 5µl (MBI Fermentas); 10X *Taq* buferis ar (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> un 25 mM MgCl<sub>2</sub> - 5µl (MBI Fermentas); dNTP (10mM) - 1µl (MBI Fermentas); Praimeris 1 (10pM/µl) - 2µl; Praimeris 2 (10pM/µl) - 2µl; *Taq* polimerāze 5u/µl (MBI Fermentas) -1µl; ūdens līdz 50µl. Praimeru pāri *B. piniarius* noteikšanai: Start1- 5' CGTTTATAAGTCATCGCCGC 3' un End1- 5' CACACTGGGCCGCACCTATG 3'; Start2- 5' CACACTGGGCCGCACCTATG 3' un End2- 5' GCGGGTCCCGTGTATAGAGG 3'. PCR reakcijas apstākļi: 30 cikli GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) 1) 95 °C -30 sek., 2) 56 °C - Start1/ End1 praimeriem vai 62 °C Start2 /End2 - 30 sek., 3) 72 °C -1 min [40]. Reakcijas beigās amplifikācijas produkti tika sadalīti elektroforētiski 1% agarozes gēlā, krāsoti ar etīdija bromīdu un aplūkoti īsviļņu UV gaismā, tika noteikts DNS fragmentu garums [41].

### 3.9. Statistiskā analīze

Patogēnu izolātu efektivitāti novērtē, aprēķinot koriģētās mirstības procentu un  $LT_{50}$  [39, 42]. Koriģētā mirstība:  $P = 100 \cdot (P_0 - C) / (100 - C)$ , kur C-mirstības procents kontrolē,  $P_0$ -novērotā mirstība [42, 43].

## 4. Rezultāti un diskusija

### 4. 1. Kaitēkļa *B. piniarius* populāciju blīvuma uzskaites parauglaukumos

2008. gadā lielākais kūniņu daudzums zemsegā konstatēts Kalsnavā, kur priežu sprīžotāja savairošanās nav raksturīga. Tas skaidrojams ar to, ka šajā reģionā netika novērota priežu rūsganās zāglapsenes savairošanās (2.tabula). Kopsavilkums par priežu sprīžotāja populācijas rādītājiem, kopš 1990. gada dots 3.tabulā.

2.tabula

Priežu sprīžotāja kūniņu uzskaites rezultāti 2008.gadā

Uzskaites laukumi	Atrasto kūniņu daudzums uzskaites laukumos					
	Venta	Mētras	Padure	Renda	Ance	Kalsnava
	2008.g.					
1.	3	3	2	2	3	2
2.	3	2	1	2	3	2
3.	3	2	1	2	2	2
4.	1	2	1	1	2	2
5.	1	2	1	1	2	2
6.	1	1	1	1	1	1
7.	1	1	1	0	1	1
8.	1	1	1	0	1	1
9.	1	1	1	0	1	1
10.	1	1	0	0	1	1
11.	1	1	0	0	0	1
12.	1	0	0	0	0	1
13.	1	0	0	0	0	1
14.	0	0	0	0	0	1
15.	0	0	0	0	0	0
16.	0	0	0	0	0	0
17.	0	0	0	0	0	0
18.	0	0	0	0	0	0
19.	0	0	0	0	0	0
20.	0	0	0	0	0	0
Vidēji uz 1m <sup>2</sup>	0,95	0,85	0,50	0,45	0,85	0,95
SE	0,22	0,21	0,14	0,17	0,23	0,17
STDS	1,00	0,93	0,61	0,76	1,04	0,76
Atrasto kūniņu skaits	19	17	10	9	17	19
Parazitēto kūniņu skaits	1	3	1	2	0	4
Parazitēšanas procents	5,3	17,6	10,0	22,2	0,0	21,1
Mātīšu kūniņu svars	0,122	0,120	0,121	0,126	0,119	0,127

Kopsavilkums par priežu sprīžotāja populācijas vidējiem rādītājiem kopš 1990. gada  
(dati no 6 parauglaukumiem)

Gads	skaitis/m <sup>2</sup>	SE	pieaugums reizes	pieaugums (%)	♀ svars (g)	Parazitētās kūniņas (%)
1990	36,00	37,88			0,104	23,8
1991	30,68	12,91	0,85	-14,8	0,091	46,0
1992	1,61	1,39	0,05	-94,8	0,092	44,1
1993	0,04	0,02	0,02	-97,6	0,096	24,7
1994	0,00	0,00	0,11	-88,7		
1995	0,00	0,00	0,85	-15,4		
1996	0,01	0,00	2,73	172,7	0,120	
1997	0,20	0,07	20,08	1908,3	0,124	15,3
1998	1,15	0,31	5,73	472,6	0,128	22,7
1999	2,05	0,48	1,78	78,3	0,120	26,3
2000	1,38	0,20	0,67	-32,5	0,124	45,9
2001	0,16	0,03	0,11	-88,6	0,130	55,8
2002	0,08	0,02	0,53	-47,4	0,121	61,1
2003	0,08	0,02	1,00	0,0	0,126	55,6
2004	0,14	0,03	1,70	70,0	0,127	30,8
2005	0,83	0,10	5,88	488,2	0,128	15,4
2006	0,83	0,09	0,99	-1,0	0,126	23,5
2007	0,77	0,09	0,93	-7,1	0,125	11,0
2008	0,76	0,10	0,99	-1,1	0,123	12,7

#### 4.2. Patogēnu sastopamība apsekotajās kaitēkļu populācijās

Atbilstoši metodikai Kurzemes un Vidzemes reģionu parauglaukumos ievākti priežu rūsganās zāglapsenes un priežu sprīžotāja kāpuri un kūniņas. Paralēli parauglaukumos ievākti priežu pūcītes, priežu zāglapsenes, iedzeltenās priežu zāglapsenes un priežu sfinksa kāpuri.

##### Priežu rūsganās zāglapsenes populāciju pētījumi

Dundagas mežniecības teritorijā starp Anci un Neveju priežu rūsganās zāglapsenes populācijā bija novērojama kodolu poliedrozes vīrusa izraisīta epizootija. Jaunaudzēs ar samērā lielu kaitēkļa populācijas blīvumu (3 – 4 ligzdas uz 1 priedi) varēja novērot ligzdas ar poliedrozi slimiem kāpuriem (5. attēls). Pēc vizuāliem novērojumiem apmēram 20 % ligzdu bija inficētas.

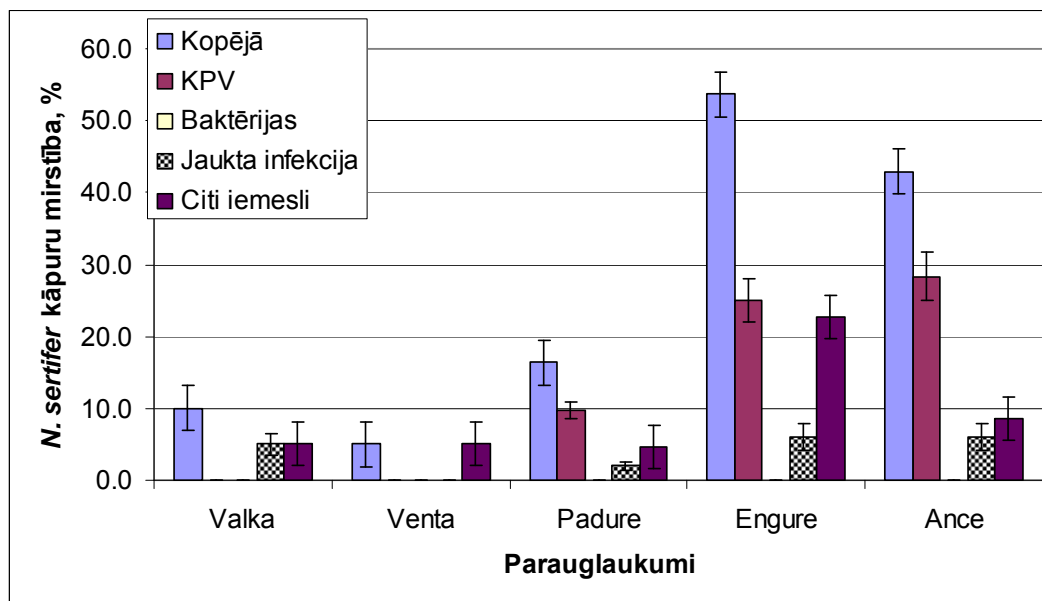


5. attēls. Ar kodolu poliedrozi slimi priežu rūsganās zāglapsenes kāpuri.

Ventas parauglaukumā (Tārgales mežsaimniecība), kur 2005. gadā tika novērota zāglapsēņu masveida savairošanās un KPV infekcija, kāpuru sastopamība bija ļoti zema, jo populācija atrodas samazināšanās (depresijas) fāzē. Ievāktais kāpuru un kūniņu materiāls bija skaitliski neliels, un ievāktie kāpuri neuzrādīja tipiskas vīrusa saslimšanas pazīmes.

Engures parauglaukumā ievāktu kāpuru mirstība kontrolē bija visaugstākā  $53,7 \pm 3,1$  %. Veicot mikroskopēšanu, patogēnu klātbūtne tika konstatēta tikai  $31,0 \pm 3,4$ % mirušo kāpuru.  $22,7 \pm 3,0$ % kāpuru netika konstatēta patogēnu klātbūtne. Netipiski mirušo kāpuru paraugi tika aizsūtīti uz Vācijas Federālo Bioloģiskās kontroles institūtu Darmštātē problēmas identificēšanai. Vācijas kolēģi apstiprināja, ka kāpuri nesatur patogēnus, izmeklējumos konstatēja urīnvielas kristālu klātbūtni, kas norāda uz novirzēm metabolisma procesos, kam par iemeslu var būt vides apstākļi oļņu ziemošanas laikā vai barošanās apstākļi.

Kāpuru mirstība Engures un Ances parauglaukumos, attiecīgi  $53,7\%$  un  $43,0\%$ , būtiski ( $P \leq 0,05$ ) atšķīrās no mirstības Valkas, Ventas un Padures parauglaukumos (6. att.). Poliedrozes vīrusu sastopamība aktīvā formā izskaidrojama ar kaitēkļa populācijas depresiju. Tipiskas bakteriozes (baktēriju izraisītas saslimšanas) netika novērotas. Engures, Ances, Padures un Valkas parauglaukumos 2 – 6 % kāpuru tika konstatētas jauktas infekcijas (KPV + baktērijas). KPV izraisītā mirstība Ancē un Engurē, attiecīgi  $28,3 \pm 3,4$  % un  $25,0 \pm 2,8$  %, ir augstāka un būtiski ( $P \leq 0,05$ ) atšķīrās no Padures ( $9,7 \pm 1,2$  %). Valkas un Ventas parauglaukumos akūta KPV infekcija netika konstatēta.

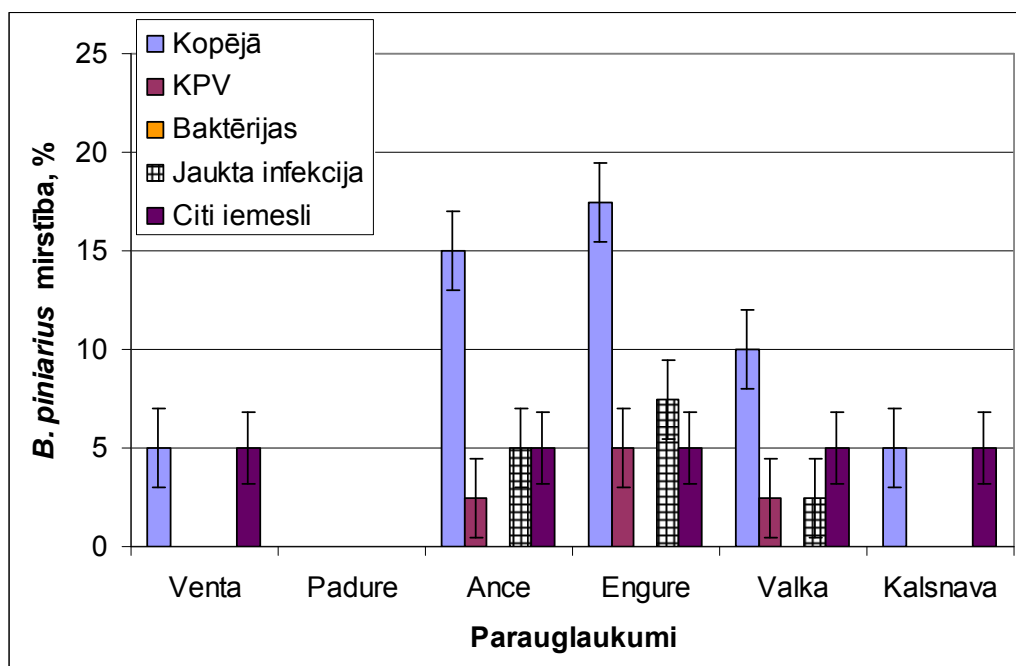


6. attēls. Parauglaukumos ievāktu priežu rūsganās zāglapsenes *N. sertifer* kāpuru mirstība no dažādiem ierosinātājiem.

Kalsnavas parauglaukumā zāglapsenes sastopamība bija ļoti zema, savairošanās pēdējos gados nav novērota, tādēļ ne kāpuri, ne kūniņas parauglaukumā atrasti netika.

#### Priežu sprīžotāja *B. piniarius* populāciju pētījumi

Ilggadīgie populāciju pētījumi liecina, ka sprīžotāju populācija šobrīd atrodas attīstības fāzē, tādēļ kāpuri ir pietiekami veseli un izturīgi. Nevienā no parauglaukumiem ievāktu kāpuru mirstība nepārsniedza 20%. Padures parauglaukumā visi ievāktie kāpuri izdzīvoja un veiksmīgi iekūņojās. Kalsnavas un Ventas parauglaukumos kāpuriem bija ļoti augsta vitalitāte, nomira tikai 5 % kāpuru (7. att.), veicot mikroskopiskos izmeklējumus patogēnu klātbūtne netika konstatēta. Kāpuru mirstība Engures un Ances parauglaukumos, attiecīgi  $17,5 \pm 2,5$  % un  $15,0 \pm 2,5$  %, būtiski ( $P < 0,05$ ) atšķīrās no mirstības Ventas (5,0%) un Kalsnavas (5,0%) parauglaukumos (7.att.). Engurē, Ancē un Valkā konstatētas jauktas infekcijas. KPV izraisītā mirstība konstatēta Engurē, Valkā, Ancē, attiecīgi,  $5,0 \pm 2,2$  %,  $2,5 \pm 2,0$  % un  $2,5 \pm 2,0$  %.



7. attēls. Parauglaukumos ievāktu priežu sprīžotāja *B. piniarius* III vecuma kāpuru mirstība un tās iemesli.

Veiktās kāpuru mikrofloras mikrobioloģiskās analīzes parādīja, ka vizuāli veselos kāpuros sastop baktērijas un mikroskopiskās sēnes. Kā redzams no 4. tabulas baktēriju kvv kopskaits kāpurā variē no  $3,5 \times 10^3$  līdz  $3,1 \times 10^6$ . Baktēriju kopskaits dažādu kaitēkļu kāpuros

4. tabula

Noteiktais baktēriju kopskaits kaitēkļu kāpuros

Kaitēkļa suga	Parauglaukums	Izmeklēto kāpuru skaits	Baktēriju skaits, tūkstoši kvv uz 1 kāpuru ± SE
<i>Neodiprion sertifer</i>	Ance	20	$36,5 \pm 17,7$
	Valka	10	$23,7 \pm 8,2$
	Vidēji parauglaukumos		$30,1 \pm 9,1$
<i>Gilpinia pallida</i>	Engure	10	$146,2 \pm 1,5$
<i>Panolis flammea</i>	Valka	3	$2739,0 \pm 862,2$
<i>Lymantria dispar</i>	Liepāja	3	$3066,4 \pm 172,5$
<i>Bupalus piniarius</i>	Kalsnava	10	$6,7 \pm 3,4$
	Valka	10	$5,9 \pm 2,1$
	Engure	10	$3,5 \pm 1,9$
	Ance	10	$4,0 \pm 0,9$
	Vidēji parauglaukumos		$5,0 \pm 1,6$

būtiski atšķiras ( $P < 0,05$ ), viszemākais baktēriju skaits konstatēts sprīžotāja kāpuros ( $5,0 \pm 1,6$ )  $\times 10^3$  kvv uz kāpuru, vislielākais baktēriju skaits konstatēts ozolu mūķenes kāpuros ( $3,0 \pm 0,1$ )  $\times 10^6$  KVV uz kāpuru. Būtiskas atšķirības baktēriju kopskaitā starp vienas sugas kāpuriem, kas ievākti dažādos parauglaukumos netika konstatētas.

#### 4.3. Entomopatogēno mikroorganismu izdalīšana no kaitēkļu kāpuriem un kūniņām

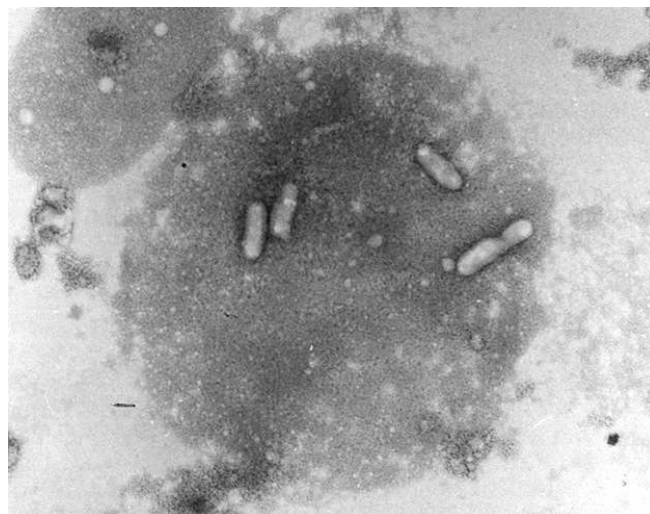
Pētījumu laikā no kaitēkļiem izdalīti un identificēti 4 kodolu poliedrozes vīrusi un to izolāti, tīrkultūrās izdalīti 45 baktēriju izolāti un 22 mikroskopisko sēņu izolāti.

Lielākā daļa izdalīto baktēriju ir sastopama dabā – augsnē vai ūdenī, taču praktiski visas izdalītās sugas īpašos apstākļos var izraisīt dzīvnieku un/vai cilvēka saslimšanu [44]. Acīmredzot vides apstākļu ietekmē tās piedalās kukaiņu, tai skaitā kaitēkļu populāciju regulēšanā. Lai varētu izvērtēt mikroorganismu nozīmi populāciju regulēšanā, jāturpina uzsāktie pētījumi, bez tam nepieciešami jauno izdalīto izolātu aktivitātes un patogenitātes novērtēšanas testi.

##### Priežu rūsganā zāglapsene *Neodiprion sertifer*

No priežu rūsganās zāglapsenes kāpuriem, imago un kūniņām izdalīti un identificēti sekojoši patogēni:

- Četri kodolu *Neodiprion sertifer* poliedrozes vīrusa izolāti: Engures izolāts, Ances izolāts, Mazsalacas izolāts, Valkas izolāts. Mikroskopiskie izmeklējumi parādīja, ka Ns KPV izolātu poliedru izmēri ir 1 – 1,4  $\mu\text{m}$ . Elektronmikroskopiskie pētījumi liecina, ka poliedri satur virionus (8. att.), kas aptver 1 nūjiņveida nukleokapsīdu.



8. attēls. *Neodiprion sertifer* KPV Engures izolāta elektronmikrogrāfija. 1% NaOH izšķīdināts poliedrs. - 0.1  $\mu\text{m}$ .



- No ievāktajiem kāpuriem un kūniņām izdalītas 15 vizuāli atšķirīgas baktērijas. Līdz sugai vai ģintij noteiktas 12 baktērijas:

*Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp., *Corynebacterium aquaticum*, *Corynebacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. *Staphylococcus equorum*, *Stenotrophomonas maltophili*, *Streptococcus* sp.

- No kāpuriem, kas tika ietekmēti ar stresa faktoriem, papildus izdalījām trīs atšķirīgas baktēriju sugas. No variantiem ar 0,5% CuSO<sub>4</sub> pielietošanu papildus izdalījām baktēriju *Pantoea agglomerans*, otru sugu identificējām, kā *Empedobacter brevis*, tomēr šeit vēl jāveic papildus izmeklējumi, jo pierādīšanas reakcijā iegūtā ticamība ir 0,8424. No variantiem ar ekstrēmu temperatūru pielietošanu papildus izdalījām *Acinetobacter lwoffii*. No kāpuriem, kūniņām un pieaugušajiem īpatņiem (9. att.) izdalītas 7 mikroskopiskās sēnes, līdz sugai vai ģintij noteiktas 5: *Beauveria bassiana* (10.att. A); *Aspergillus* sp. (10.att. B); *Entomophaga* sp.; *Verticillium* sp. un *Mycelia sterila*.



A

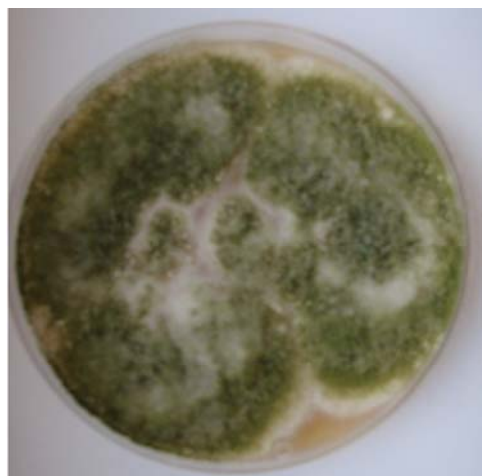


B

9. attēls. A - ar sēnes micēliju apaugusi priežu rūsganās zāglapsenes māfīte, B - epidermas fragments ar hifām, gaismas mikroskopija (x 400).



A



B

10. attēls. No priežu rūsganās zāglapsenes kūņiņām izdalīta *Beauveria bassiana* un *Aspergillus* sp. kolonija.

### **Parastā zāglapsene *Diprion pini***

No parastās zāglapsenes kāpuriem pielietojot stresa faktorus izdalīti divi *Dp* KPV izolāti (Ances un Engures). Apskatot gaismas mikroskopā vīrusa poliedru izmēri ir 0,9 – 1,5 μm. Precīzai identificēšanai un morfoloģisko aprakstu sagatavošanai turpmāk nepieciešami elektronmikroskopiskie izmeklējumi.

Engures parauglaukumā ievākti ar sēnēm *Aspergillus parasiticus* un *Zoophthora* sp. inficēti zāglapsenes kāpuri.

### **Iedzeltenā priežu zāglapsene *Gilpinia pallida***

No iedzeltenās priežu zāglapsenes kāpuriem izdalītas 3 vizuāli atšķirīgas baktērijas. No kāpuriem izdalītas divas nosacīti patogēnās baktērijas: *Bacillus* sp, un *Pantoea agglomerans*.

### **Priežu pūcīte *Panolis flammea***

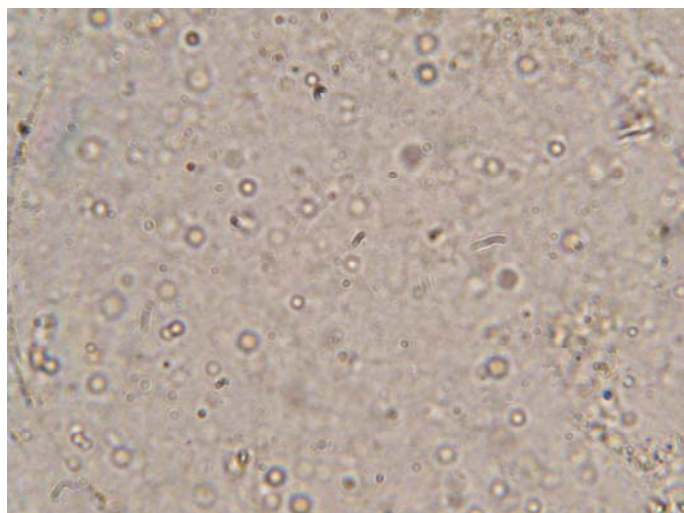
No priežu pūcītes kāpuriem izdalītas 3 vizuāli atšķirīgas baktēriju sugas. Nav izdevies iegūt tīrkultūras un identificēt.

No kāpuriem izdalītas 4 mikroskopiskās sēnes, kas pieder pie *Aspergillus*, *Metarhizium* un *Penicillium* ģintīm.

### **Priežu sprīžotājs *Bupalus piniarius***

No priežu sprīžotāja kāpuriem izdalīti un identificēti sekojoši patogēni:

- Trīs *Bp* KPV izolāti: Engures izolāts (11. att.), Ances izolāts, Valkas izolāts. Mikroskopiskie izmeklējumi parādīja, ka *Bp* KPV izolātu poliedru izmēri ir 0,8 – 1,4 μm. Sagatavoti preparāti elektronmikroskopiskiem izmeklējumiem.
- No kāpuriem un kūniņām izdalītas 14 vizuāli atšķirīgas baktēriju sugas. Uzsākta baktēriju identifikācija. Identificētas baktērijas *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp. un *Serratia marcescens*.
- No kāpuriem un kūniņām izdalītas 9 mikroskopisko sēņu sugas, kas pieder pie *Aspergillus*, *Fusarium* (12.att.), *Penicillium*, *Verticillium*, *Paecilomyces* un *Metarhizium* (12.att.) ģintīm.



11.attēls. Kodolu poliedrozes vīrusa *Bp* KPV Engures izolāts, gaismas mikroskopija (x 1000).



A



B

12. attēls. No priežu sprīžotāja izdalīto sēņu kolonijas, A - *Fusarium* sp. B - *Metarhizium* sp.

### **Priežu sfings *Sfinx pinastri***

No Engures parauglaukumā ievāktā priežu sfinksa kāpura izdalīta viena entomopatogēnā sēne *Verticillium* sp. (13. att.).

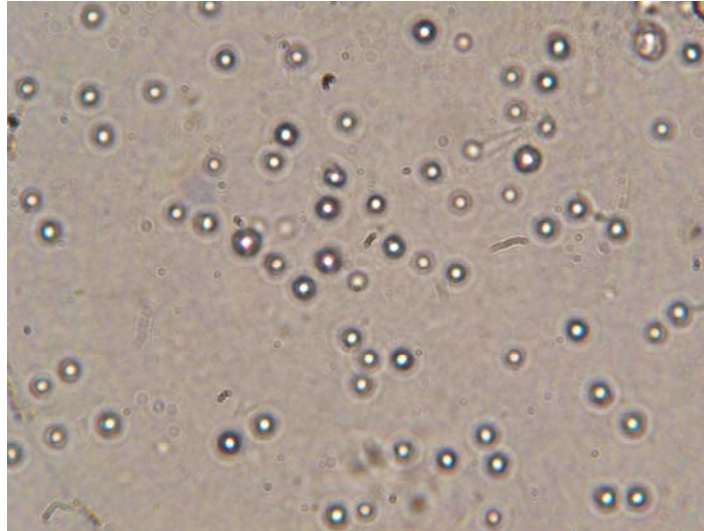


13. attēls. Ar sēni *Verticillium* sp. inficēts priežu sfinksa kāpurs

### **Ozolu mūķene *Lymantria dispar***

Kaitēkļa populācijas blīvums Liepājas apkārtnē bija augsts, kas darbojas kā iniciators persistento slimību izpausmei. Laboratorijā tika nogādāti 50 kāpuri, no tiem izdzīvoja un sekmīgi iekūņojās 22 % ± 0.7% kāpuru, 46 ± 0.9 % kāpuru tika konstatēta kodolu poliedroze, ko izraisījis *Lymantria dispar* KPV, atlikušajiem 32 % kāpuru konstatēti parazīti – jātniecīņi un kāpurmušas (entomoloģiskais materiāls fiksēts un nodots speciālistiem sugu noteikšanai).

No ievāktajiem kāpuriem un kūniņām izdalīts kodolu poliedrozes vīruss.



14. attēls. *L. dispar* kodolu poliedrozes vīrusa poliedri, gaismas mikroskopija (x 1000).

- No ievāktajiem kāpuriem un kūniņām izdalītas 7 vizuāli atšķirīgas baktērijas. Līdz sugai vai ģintij noteiktas 6 baktērijas: *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium* sp. – 2 baktērijas, *Bacillus circulans*, *B. subtilis* un *Bacillus* sp.

#### 4.4. Stresa faktoru lietošana vīrusu infekcijas aktivizēšanai

Apslēptās (persistentās un latentās) infekcijas var ilgstoši saglabāties kukaiņu populācijās un pāriet no vienas ģenerācijas uz nākamajām. Kukaiņiem nonākot nelabvēlīgos ārējās vides apstākļos (palielināts kukaiņu blīvums, nepietiekama, netipiska vai nepilnvērtīga barība, vides temperatūras novirzes no kukaiņu attīstībai optimālā režīma u.c.) kukaiņu fizioloģiskais stāvoklis novājinās, pazeminās rezistence un apslēptā infekcija pāriet akūtā formā. Lai aktivizētu vīrusinfekcijas, kurām simptomi vizuāli nav novērojami, pētāmos kukaiņus pakļāvām dažādu stresa faktoru iedarbībai (5. tabula). Pētījumos izmantojām kaitēkļu kāpurus, kas ievākti parauglaukumos, kur bija neliela dabiskā mirstība.

## Stresa faktoru efektivitāte vīrusinfekcijas aktivizēšanā

Kukaiņu suga	Pielietotais stresa faktors	Kāpuru attīstības stadija	Kāpuru skaits variantā	LT <sub>50</sub> ± sLT <sub>50</sub> , dienas	Koriģētā mirstība ± SE, %
Priežu rūsganā zāglapsene <i>N. sertifer</i>	Neradniecisks vīruss (Mn NPV)	III	200	19,1 ± 0,6 a	52,5 ± 4,1 b
	Temperatūras maiņa	III	200	16,2 ± 1,0 ab	77,3 ± 4,9 a
	1% borskābe	III	200	*	6,5 ± 2,3 c
	0,5 % Cu SO <sub>4</sub>	III	200	13,9 ± 0,5 b	80,0 ± 3,5 a
	Barības maiņa	III	200	*	42,3 ± 6,1 b
Iedzeltenā zāglapsene <i>G. pallida</i>	Neradniecisks vīruss (Ns KPV)	II	50	*	30,2 ± 5,7
Parastā zāglapsene <i>D. pini</i>	Neradniecisks vīruss (Ns KPV)	II - III	50	24,5 ± 2,8 a	56,7 ± 5,1
Priežu sprīžmetis <i>B. piniarius</i>	Neradniecisks vīruss (Ns KPV)	III - IV	60	25,2 ± 3,9 a	56,9 ± 6,2 b
	Temperatūras maiņa	III - IV	60	15,4 ± 1,8 b	96,9 ± 6,0 a
	1 % borskābe	III- IV	60	*	31,0 ± 4,2 c
	0,5 % Cu SO <sub>4</sub>	III - IV	60	26,5 ± 1,7 a	60,9 ± 3,9 b
	Barības maiņa	III - IV	60	27,2 ± 1,9 a	54,9 ± 2,9 b

P.S. lielumi, kas apzīmēti ar vienu un to pašu burtu būtiski neatšķiras pie  $P > 0.05$ , - \* variantos kaitēkļu koriģētā mirstība nesasniedz 50%,

No 5. tabulas redzams, ka pētāmie skuju koku meža kaitēkļi satur kodolu poliedrozes vīrusu latentā vai persistentā formā, kas stresa faktoru iedarbības rezultātā pāriet aktīvā formā, izraisot kukaiņu saslimšanu un atmiršanu.

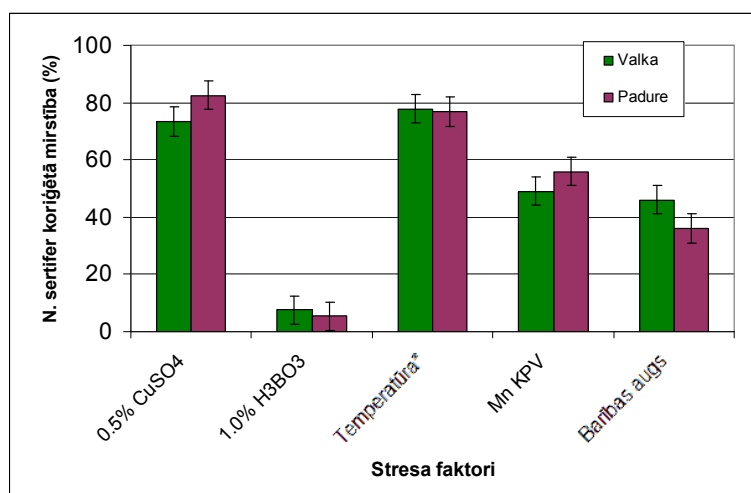
Priežu rūsganās zāglapsenes vīrusa aktivizēšanai visefektīvākais stresa faktors bija ekstremālās temperatūras svārstības (5. tabula). Priežu skuju apstrāde ar 1% borskābi spēja izraisīt tikai 6.5 % *N. sertifer* kāpuru mirstību ( $P < 0.01$ ).

Attiecīgo kukaiņu sugu vīrusa identificēšanai veicām arī mikroskopiskos izmeklējumus gaismas mikroskopā. Turpmākiem izmeklējumiem sagatavoti preparāti elektronmikroskopiskiem pētījumiem. Desmitajā dienā pēc apstrādes ar stresa faktoriem vislielākais poliedru daudzums producējās zāglapsenes kāpuros, kas pakļauti straujām vides temperatūras maiņām ( $4 \times 10^8$  pol/kāpuru,  $P < 0,01$ ). Savukārt 0,5 % vara sulfāta lietošana, ietekmē rūsganās priežu zāglapsenes

barošanās intensitāti, saslimšanas pazīmes parādās agrāk, taču samazinās kāpura svara pieaugums, ekskrementu daudzums. Mirušajiem *N. sertifer* kāpuriem neparādās tipiskas vīrusa infekcijas pazīmes un producēto poliedru daudzums ir zems.

Visos gadījumos vīrusa aktivizācijas periods bija salīdzinoši ilgs, vairumā gadījumu aprēķinātais  $LT_{50}$  ir 13,9 - 19,1 dienas. Tas nozīmē, ka turpmāk nepieciešams veikt selekcijas darbu, jaunu augsti virulentu celmu, kuriem būtu salīdzinoši īss inkubācijas periods, iegūšanai.

Literatūrā sastopami dati, ka dažādām kaitēkļu populācijām var būt atšķirīgi entomopatogēni un to iedarbības efektivitāte [2, 4]. Salīdzinājām divas zāglapseņu populācijas, kur būtiski neatšķiras populāciju blīvums. Stresa faktoru ietekme uz Padures un Valkas parauglaukumos ievāktiem *N. sertifer* III vecuma kāpuriem un to mirstību būtiski neatšķiras ( $P > 0.05$ ) (15. att.).



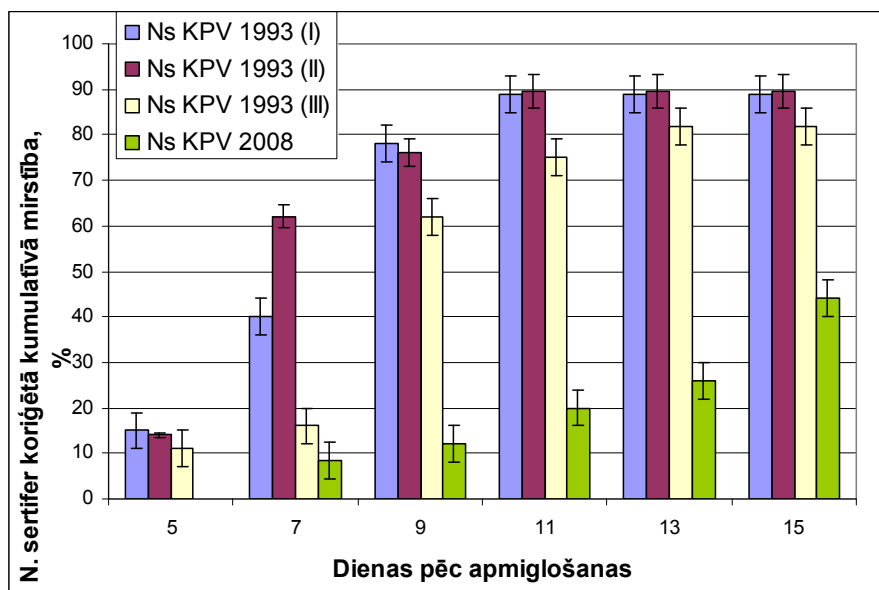
15.attēls. Valkas un Padures parauglaukumos ievāktu *N. sertifer* III vecuma kāpuru koriģētā mirstība stresa faktoru ietekmē.

Priežu sprīžotāja vīrusa aktivizācija visefektīvāk izpaudās variantā ar ekstremālām temperatūras svārstībām  $96,9 \pm 6,0\%$  ( $P < 0.01$ ). Savukārt 0,5 % CuSO<sub>4</sub>, neradniecisku vīrusu pielietošana un barības maiņa attiecīgi izraisa  $60,9 \pm 3,9\%$ ,  $56,9 \pm 6,2\%$  un  $54,9 \pm 2,9\%$  kāpuru mirstību. KPV veidošanās tika pierādīta mikroskopiski un pielietojot molekulārās metodes.

#### 4.5. Lauka eksperimenti un pielietošanas augu aizsardzībā izvērtēšana

Lauka eksperimentos pārbaudījām Ns KPV 1993. gadā un šogad izdalītu izolātu efektivitāti. Iegūtie izmēģinājumu rezultāti (16. att.) liecina, ka neskatoties uz ilgo glabāšanu 1993. gadā pagatavotie vīrusa preparāti ir saglabājuši ļoti augstu efektivitāti, 11 dienā mirst  $75 \pm 4,0\%$  -  $89,8 \pm 3,6\%$  kāpuru, 15 dienā  $81,9 \pm 4,0\%$  -  $89,8 \pm 3,6\%$ . Aprēķinātais  $LT_{50}$  būtiski

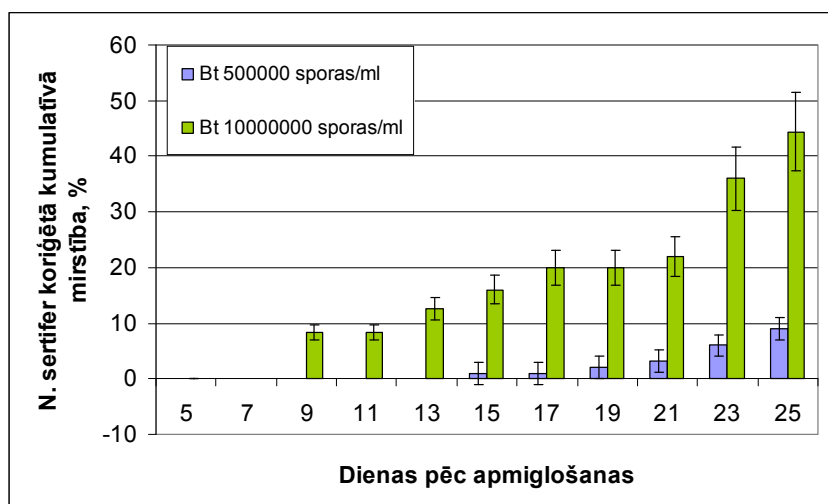
neatšķirās preparatīvajām formām I, II, III, attiecīgi  $7,9 \pm 0,6$ ,  $7,2 \pm 0,7$  un  $8,9 \pm 0,9$  dienas,  $P > 0,05$ . Preparatīvājo formu (ūdens - glicerīna suspensija, šķidrā forma ar pildvielām selīts un PVA-M un sasaldēšana) efektivitātē būtiskas atšķirības netika konstatētas,  $P > 0,05$ . Salīdzinoši šogad no zāglapsenēm izdalītā vīrusa efektivitāte bija salīdzinoši zema un nerasniedza  $45,0 \pm 4,0\%$  ( $P < 0,05$ ). Tas nozīmē, ka turpmāk nepieciešams veikt pasākumus, lai uzlabotu izolātu efektivitāti, pasažējot tos caur kaitēkļa organismu paralēli ietekmējot ar dažādiem stresa faktoriem.



16. attēls. *N. sertifer* mirstības dinamika pēc apmigošanas ar Ns KPV izolātiem.

Lauka eksperimentos pārbaudījām no *B. thuringiensis* suspensiju divu dažādu koncentrāciju efektivitāti. Baktēriju suspensijas (konc.  $1,0 \times 10^7$  sporas/ml) efektivitāte, jeb kāpuru koriģētā mirstība, sākot no 9 dienas pēc apmigošanas būtiski atšķiras no zemākās koncentrācijas suspensijas,  $P < 0,05$  (17. att.). 17. attēlā redzams, ka *B. thuringiensis* efektivitāte 25 dienā pēc apmigošanas nerasniedz pat 50 %. Infekcijas attīstība notiek lēni. Apmiglojot kāpurus ar suspensiju  $5,0 \times 10^5$  sporas/ml, koriģētā mirstība sasniedz tikai  $8,9 \pm 2,0\%$ . Salīdzinoši zemā *B. thuringiensis* efektivitāte saistīta toksīnu specifiku, tie ir aktīvi tikai ierobežotām kukaiņu grupām, katram no toksīniem ir savs saimnieku spektrs. Pārbaudītais baktēriju celms izdalīts no tauriņiem, tādēļ aktivitāte pret zāglapsenēm ir vāja. Bez tam jāņem vērā ka tīrkultūra ilgstoši tika uzglabāta uz barotnēm. Pētījums apstiprina datus, ka, lai baktēriju kultūras saglabātu virulenci, tās nepieciešams regulāri pasažēt caur saimnieka organismu [44].





17. attēls. *N. sertifer* mirstības dinamika pēc apmieglošanas ar *B. thuringiensis* suspensijām.

#### 4.6. Vīrusbrīvas kaitēkļu laboratorijas kultūras izveidošana

Šim nolūkam projekta ietvaros iegādāta veģetācijas kamera. No vizuāli veselīgiem priežu rūsganās zāglapsenes kāpuriem laboratorijas apstākļos tika iegūti 1640 kokoni (18. attēls). Kokoni audzēti veģetācijas kamerā. Kopā eksperimentā no kokoniem izlidoja 1002 dzīvotspējīgas zāglapsenes, parazitēts bija 21 kokons, no patogēnu infekcijas klātbūtnes bojā gāja 44 kokoni (6. tabula). Nelielā parazitū klātbūtne izskaidrojama ar kāpuru ievākšanu 3 vecumā un pārvietošanu uz laboratoriju pirms parazitēti tos bija infestējuši.



18. attēls. Laboratorijā iegūtie priežu rūsganās zāglapsenes kokoni.

Priežu rūsganās zāglapšanas kokonu audzēšanas rezultāti

Ievākšanas vieta	Kokonu skaits	Izlidojušo zāglapšanu daudzums (%)	Mātīšu īpatsvars (%)	Parazitēto kokonu daudzums (%)	Bojā gājušo kokonu daudzums (%)
Ance	830	64,8	71,4	2,1	2,3
Engure	810	57,2	83,6	0,4	3,1
Vidēji		61,0	77,5	1,25	2,7
SE		3,8	6,1	0,85	0,4

Izaudzētos zāglapšanu tēviņus un mātītes turpināja audzēt uz priežu skujām oliņu iegūšanai. Uz priežu skujām iegūti 96 *N. sertifer* dējumi, kas liecina par kaitēkļa audzēšanas iespējām laboratorijā. Laboratorijā nākamās paaudzes iegūšanai tiek uzglabātas arī 500 diapauzējoši *N. sertifer* kokoni. Tā kā iepriekšējie eksperimenti pierādīja, ka visās apsekotajās populācijās sastopamas KPV vīrusa infekcijas (aktīvā vai persistentā formā), lai izveidotu vīrusbrīvu populāciju būs nepieciešams papildus veikt īpatņu atlasī vairākus gadus.

Priežu sprīžotāja attīstības cikls vēl nav noslēdzies, jo ziemošana notiek kūniņas stadijā. No vizuāli veselīgiem sprīžotāja īpatņiem iegūtas 100 kūniņas, kas tiek uzglabātas šogad iegādātajā veģetācijas kamerā. Pieaugušo īpatņu izlidošana tiek plānota martā.

Laboratorijas apstākļos no ievāktajām 100 kūniņām izaudzēti 39 *Lymantria dispar* pieaugušie īpatņi (7. tabula, 19. att.) un iegūti 22 dējumi, kas tiks izmantoti nākamā gada pētījumos.

Ozolu mūķenes kūniņu audzēšanas rezultāti

Varianti	Kūniņu skaits	Izlidojušo mūķeņu daudzums (%)	Mātīšu īpatsvars (%)	Parazitēto kūniņu daudzums (%)	Vīrusinficēto kūniņu daudzums (%)
1	50	34,0	35,3	58,0	8,0
2	50	44,0	47,0	52,0	4,0
Vidēji		39,0	41,2	55,0	6,0
SE		7,0	8,3	4,2	2,8



19. attēls. No Liepājas apkārtnē ievāktajām kūniņām izšķīlies ozolu mūķenes tēviņš.

#### 4.7. Vīrusbrīvu populāciju diagnostika, izmantojot molekulāros marķierus

Vīrusbrīvu populāciju pierādīšanai rūsganās zāglapsenes kāpurus un kokonus ievācām Valkas un Ventas parauglaukumos, kur netika konstatēta akūta KPV infekcija, bet tika panākta vīrusa infekcijas aktivizēšanās pielietojot stresa faktorus. Pielietojot selektīvu metodi, kas balstās uz poliedrīn-specifiskas DNS amplifikāciju ar polimerāzes ķēdes reakciju arī Valkas un Ventas populācijā ieguvām apstiprinošus (KPV +) rezultātus persistentu vai latentu infekciju klātbūtnei populācijā.

Priežu sprīžotājus DNS analīzēm ievācām Ventā, Kalsnavā un Padurē. Pielietojot selektīvo metodi Padures un Ventas populācijā ieguvām apstiprinošus (KPV +) rezultātus persistentu vai latentu infekciju klātbūtnei populācijā. KPV klātbūtne netika pierādīta Kalsnavas populācijā. Pētījumi jāturpina, jo šogad izmeklēto kāpuru skaits bija neliels (18), kas neļauj pārlicinoši spriest par visu populāciju kopumā.

#### 4.8. Zinātniskas publikācijas sagatavošana

Sagatavotas sekojošas publikācijas:

1. Jankevica L., Seskena R., Smits A., Zarins I. (2008) Future potential for biological control of *Neodiprion sertifer* Geoffr. and *Bupalus piniarius* L. in Latvia: occurrence and variability of pathogen. In: Programm and Abstracts, 41<sup>th</sup> annual meeting of the SIP and 9<sup>th</sup> international conference on *Bacillus thuringiensis*, 3 - 7 August, Coventry, Warwick, UK, 92.

2. Seskena R., Petrova V., Jankevica M., Jankevica L. (2008) Studies on ecological and physiological host range of entomopathogenic Hyphomycetes. *IOBC/WPRS Bulletin*, 31 (1) 198-203.
3. Jankevica L., Seskena R., Halimona J., Zarins I. Associations between baculoviruses and dendrophagous insects recorded in Latvia (manuskripts, sagatavots iesniegšanai).

## Secinājumi

1. 2008.gadā priežu sprīžotāja populācijas neraksturojas ar strauju savairošanos, vidējais sprīžotāja kūniņu daudzums zemsegā 0,76 kūniņas uz m<sup>2</sup>. Savukārt zāglapsenes populācija raksturojas ar depresijas periodu, pēc masveida savairošanās 2005. gadā.
2. Priežu rūsganās zāglapsenes depresīvajās populācijās kodolu poliedrozes vīruss sastopams aktīvā formā (KPV mirstība Engurē - 28,3±3,4%, Ancē – 25,0±2,8%, Padurē - 9,7±1,2%) vai persistentā formā, ko var aktivizēt pielietojot stresa faktorus (Valka, Venta). KPV sastopamība būtiski atšķiras starp parauglaukumiem (P<0,05).
3. Priežu sprīžotāja populācijās sastopams kodolu poliedrozes vīruss aktīvā formā, (KPV mirstība Engurē - 5,0±2,2%, Valkā - 2,5±2,0%, Ancē - 2,5±2,0%) vai persistentā formā (Venta, Padure).
4. Vizuāli veselos kaitēkļu kāpuros sastopamas baktērijas, baktēriju kopskaits dažādu sugu kaitēkļu kāpuros būtiski atšķiras (P<0,05), vidēji 1 sprīžotāja kāpurā  $(5,0 \pm 1,6) \times 10^3$  KVV, rūsgano zāglapseņu kāpurās  $(3,1 \pm 0,9) \times 10^4$  KVV, priežu pūcītes un ozolu mūķenes kāpuros, attiecīgi,  $(2,7 \pm 0,8) \times 10^6$  un  $(3,0 \pm 0,1) \times 10^6$  KVV uz kāpuru.
5. No kaitēkļu kāpuriem un kūniņām izdalīti gan patogēni, gan nosacīti patogēni mikroorganismi. Kodolu poliedrozes vīrusi izdalīti no 4 kaitēkļu sugām. No *N. sertifer* izdalītas 15 vizuāli atšķirīgas baktērija sugas, kas pieder pie 10 ģintīm un 7 mikroskopiskās sēnes no 6 ģintīm. No *B. piniarius* izdalītas 14 baktēriju sugas un 9 mikroskopiskās sēnes no 6 ģintīm.
6. Pielietojot dažādus vīrusa inducētājfaktorus (stresa faktorus) izdevies aktivizēt poliedrozes tipa vīrusu priežu rūsganās zāglapsenes, priežu zāglapsenes, iedzeltenās priežu zāglapsenes un priežu sprīžmeša kāpuros.
7. Vislabākie rezultāti iegūti, kā stresa faktorus izmantojot ekstrēmas temperatūras maiņas, priežu rūsganās zāglapsenes mirstība 77,3 ± 4,9%, sprīžotāja - 96,9± 6,0%. Viszemākā efektivitāte konstatēta 1% borskābes pielietošanai, priežu rūsganās zāglapsenes mirstība 6,5±%, sprīžotāja – 31,0±%.

8. Lauka eksperimentos pierādīts, ka Ns KPV preparāti ir efektīvi rūsganās priežu zāglapsenes ierobežotāji. Ns KPV 1993. gada izolāta preparatīvās formas, 15 dienas pēc apmieglošanas, izraisa kāpuru mirstību  $81,9 \pm 4,0\%$  –  $89,8 \pm 3,6\%$ . Vīrusa preparāta efektivitāte būtiski neatšķiras ( $P > 0,05$ ) atkarībā no pielietotās preparatīvās formas (saldēšana, uzglabāšana ūdens – glicerīna suspensijā un ar pievienotām pildvielām selīts un PVA-M).
9. *B. thuringiensis* suspensija lauka apstākļos izraisa *N. sertifer* mirstību, efektivitāte  $44,4 \pm 7,1\%$ . *B. thuringiensis* efektivitāte būtiski atšķiras pielietojot atšķirīgas koncentrācijas;  $1,0 \times 10^7$  sporas/ml –  $44,4 \pm 7,1\%$ ;  $5,0 \times 10^5$  sporas/ml –  $8,9 \pm 2,0\%$ .
10. Kaitēkļus *N. sertifer*, *B. piniarius* un *L. dispar* iespējams pavairot laboratorijā, par ko liecina laboratorijā izaudzētie pieaugušie īpatņi un iegūtie dējumi, *N. sertifer* - 1002 pieaugušie īpatņi un 96 dējumi, *L. dispar* – 39 pieaugušie īpatņi, 22 dējumi, tomēr, lai iegūtu vīrusbrīvu populāciju nepieciešams vairāku ģenerāciju laikā veikt atkārtotu veselo kāpuru atlasī.
11. Pielietojot molekulāros marķierus un selektīvu metodi, apstiprinājām perzistentu un latentu KPV infekciju klātbūtni rūsganās zāglapsenes populācijās Valkas un Ventas parauglaukumos. Kalsnavas parauglaukumā KPV klātbūtne sprīžotāja populācijā netika pierādīta.

## Literatūra

1. Huber, J (1986) Use of baculoviruses in pest management programs. In: *The Biology of Baculoviruses*, Vol. 2. R R Granados, & B A Federici, (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL., pp 63-87.
2. Tanada, Y. & Fuxa, J.R. 1989 The pathogen population. In: *Epizootiology of insect diseases*. Fuxa, J.R & Tanada, Y. eds, Wiley-Interscience, New York, 113 - 150.
3. Eilenberg J., Vestergaard, S. 2003. The importance of ecological studies for risk assessment of insect-pathogenic fungi. *IOBC/WPRS Bulletin*, 21.
4. The Plant Protection Products Directive (91/414/EEC), 1991.
5. Entwistle, P. F. (1998). A world survey of virus control of insect pests. In: *Insect Viruses and Pest Management*. Hunter-Fujita et al. eds., UK, 189-200.
6. Gelertner, W.D. and Federici, B.A. (1986) Isolation, identification and determination of virulence of nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, *Sodoptera exigua*: dominance of a single viral genotype. *Environ. Entomol.*, 15 (2): 240-245.
7. Keddie, A., Erlandson, M. 1995. Characterization of a Nuclear Polyhedrosis Virus from the Forest Tent Caterpillar, *Malacosoma disstria*. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 43-47.
8. Cunningham, J.C. & Entwistle, P.F. (1981). Control of sawflies by baculovirus In: *Microbial control of pests and plant disease*. Burgess H.D. ed., New York: 470-478.
9. Magnoler, A. (1985). Field evaluation of Baculovirus against *Malacosoma neustria* L in Sardinia. *La difesa delle piante*, 2, 329-338 (in Italian).
10. Schmidt, M., SchÖnberr, J. and Wellenstein, G. (1994) Versuche zur biologischen SchÄdlingsbekÄmpfung mit insektenpathogenen Viren. *J. Appl. Ent.* 117, 414 – 423.
11. Olofsson, E. (1987) Environmental persistence of the nuclear polyhedrosis virus of the European pine sawfly in relation to epizootics in Swedish scots pine forests. *J. Invertebr. Pathol.* 52: 119-129.
12. Strasser, H. (2000). A researcher's obstacle race: report on the registration of a new bioinsecticide. *IOBC Bulletin*, Vol.23 (2): 9 – 13.
13. Charnley, A. K. (1997). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: *The Mycota IV*. Wicklow & Soderstrom (eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 185-201.
14. GrÖner, A. (1986). Specificity and safety of baculoviruses, in *The Biology of Baculoviruses*. vol. 1. Granados. R. R.. & Federici. B. A., Eds., CRC Press. Boca Raton, FL, p. 177.
15. Evans, H. F. (1986). Ecology and epizootiology of baculoviruses. in: *The Biology of Baculoviruses*, vol. 1, Granados, R. R. & Federici. B. A.. eds., CRC Press. Boca Raton. FL. p. 89.
16. Mohamed, M.A., Coppel, H.C., Podgwaite, J.D. (1982). Persistence in soil and on foliage of nucleopolyhedrosis virus of the European pine sawfly, *Neodiprion sertifer* (*Hymenoptera: Diprionidae*). *Environ. Entomology*, 11: 1116-1118.
17. Onstad, D. W. & McManus, M. L. (1996). Risks of host-range expansion by insect-parasitic biocontrol agents. *BioScience*, 46: 430-435.
18. Weiser, J. (2000.) Forty years of organized international insect pathology. *IOBC Bulletin*, 23: 3-7.
19. Saville, G.P., Huges, D.S., Shreeve, T., King, L.A. & Possee, R.D. (1997) Baculovirus insecticides: detection of latent baculoviruses in natural insect populations. In: *Proceedings of International Symposium "Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?"*, UK, 255-260.

20. Olofsson, E. (1987) Mortality factors in a population of *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae). *OIKOS* 48: 297-303.
21. Kunimi, Y. (1993). A list of insect diseases of Japanese insects. In Iwahana H., Okada M., Kunimi Y., and Shimazu M. [eds.], *Manual for the Research on Insect Pathogens*. Nihon Shokubutuboeki-kyoukai, Tokyo, p222.
22. Humber, R.A. (1992). Collection of entomopathogenic fungal cultures: catalog of strains, 1992. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service. ARS-110. 177pp. (Plant Protection Research Unit, U.S. Plant, Soil, and Water Laboratory, Tower Rd., Ithaca, N. Y. 14853-0331
23. Ozols, G. (1985). Priedes un egles dendrofāgie kukaiņi Latvijas mežos. Rīga, "Zinātne", 207 lpp.
24. Zariņš, I. & Eglīte, G. (1993). Investigation of entomopathogenous viruses in Latvia & their potential as pest control agents. *Proc Latv. Acad. Sc. Part B*, 57: 49-53.
25. Jankevica, L., Kropa, M., Zariņš, I. & Jankevics, E. (2000). Presence of nucleopolyhedroviruses in forest and orchard pest populations in Latvia. In: Proc. of Int. Conf. "Development of environmentally friendly plant protection in the Baltic Region", September 28-29, Tartu Estonia, 57 –59.
26. Cudare Z. (1998). Biodiversity of entomopathogenic fungi in Latvia and their potential in plant protection. *IOBC Bulletin, Vol.21(4)*: 85-88.
27. Eglīte, G. & Zariņš, I. (1993). The European pini sawfly nuclear polyhedrosis virus and its application to insect pests control *Proc Latv. Acad. Sc. Part B*, Nr 57: 73-78.
28. Adams, J.R. & Bonami, J.R. (1991). Preparation of invertebrate viruses and tissues for examination. In: *Atlas of Invertebrate Viruses*. Eds. Adams JR, Bonami JR. CRC Press; Boca Raton, USA, 9-30.
29. Lacey, L.A., Brooks W. M. (1997) Initial handling and diagnosis of diseased insects. In: *Manual of techniques in insect pathology*, Ed. Lacey L. Acad. Press San Diego, 1-15.
30. Evans, H.F. & Shapiro, M. (1997) Viruses. In: *Manual of techniques in insect pathology*. 17-53.
31. Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F., & Crook, N. E. (1998). *Insect Viruses and Pest Management*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 1-620.
32. BD BBL Crystal Identification Systems. (2005). Becton Dickinson and Company. 1- 43.
33. Thiery, I., Frachon, E. (1997). Identification, isolation, culture und preservation of entomopathogenic bacteria. In: *Manual of techniques in insect pathology*, Ed. Lacey L. Acad. Press San Diego, 55-77.
34. Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect fungi*. Third edition. Burgess Publishing Company, 53-131 pp.
35. Humber, R. A (1997) Fungi identification. In: *Manual of techniques in insect pathology*. Ed. Lacey L. Acad. Press San Diego, 153-185.
36. Keller, S. (2007). Arthropod-pathogenic Entomophthorales: Biology, Ecology, Identification. COST Action 842. EUR 22829. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 157 pp.
37. Koval, E. Z. (2007). *Flora Fungorum Ucrainical. Zygomycotina Entomophthorales*. Kyiv: «Avokado», 369 c. (in rusian).
38. Zariņš, I. (2001). Possibilities of the use of entomopathogenous viruses to control the multiplying of the nun moth (*Lymantria monacha* L.) and the pine looper (*Bupalus piniarius* L.) in the coniferous forests of Latvia: *Latvijas Entomologs*, 38: 41-51.
39. Hughes, P. R. and Wood, H. A. (1987) In vivo and in vitro bioassay methods for baculoviruses, In: *The Biology of Baculoviruses, vol 2 Practical Application for Insect Control* (Granados, R R and Fedenci, B A, eds), CRC, Boca Raton, FL, pp. 1-30.

40. Jankevica, L. (2000). Ecological interaction between baculoviruses and pest populations and its role in biological control, Ph D Theses, Riga, University of Latvia, 1 – 100.
41. Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982): Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, New-York.
42. Lipa, J., Sliýynski, K. (1973) Wskarowki metodyczne i terminologia do wyznaczenia srednij dawki smiertelnej (LD<sub>50</sub>) w patologii orwadów i toksykologii (Methodical instructions and terminology for calculation of Median Lethal Dose in insect pathology and toxicology). *Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roslin*, 15 (1), 59 -83 (in Polish).
43. Finny, D. J. (1971). Probit Analysis 3<sup>rd</sup> edition, Cambridge University Press, England. 1-212.
44. Brock T. D. 1979. Biology of microorganisms. Third Edition. London: Prentice/Hall International, Inc., 1 - 802.