

Литература

Бабич О.А. Особливості поширення та вдосконалення моніторингу хмельової цистоутворюючої нематою / Бабич О.А., Бабич А.Г. // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2010. – №145. – С. 136–140.

Кирьянова Е.С. Паразитические нематоды растений и меры борьбы с ними. – Т. 1. / Е.С. Кирьянова, Э. Л. Кралль – Л.: Наука, 1969. – 447 с.

Сигарьова Д.Д. Методичні рекомендації до проведення лабораторних занять із напрямку 6.090101 – „Захист рослин”: Виявлення, облік та заходи захисту від найбільш шкідливих нематод хмелю / Д.Д. Сигарьова, А.Г. Бабич, О.А. Бабич, В.М. Венгер – К.: Вид. центр НУБіПУ, 2010. – 14 с.

Сигарева Д. Д. Методические указания по выявлению и учету паразитических нематод полевых культур / Д. Д. Сигарева. – К.: Урожай, 1986. – 38 с.

Шестеперов А.А. Выявление и учет фитогельминтозов: Метод. Пособие. / А.А. Шестеперов, Г.Н. Шавров – Воронеж, 1984. – 86 с.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ НЕМАТОД СЕМЕЙСТВ STEINERNEMATIDAE И HETERORHABDITIDAE НА ТЕРИТОРИИ УКРАИНЫ

Д. Д. Сигарева, В. В. Олененко, Н. В. Грацианова

Институт защиты растений НААН Украины, ул. Васильковская, 33, Киев 03022, Украина, galaganta@mail.ru

Энтомопатогенные нематоды семейств *Steinernematidae* и *Heterorhabditidae* в симбиозе с бактериями *Enterobacteriaceae* способны вызывать быструю гибель насекомых, в том числе почвообитающих и скрытоживущих, что дает возможность использовать их в качестве агентов биологического контроля (Sigareva *et al.*, 2008).

Первые находки энтомопатогенных нематод связаны с анализом причин гибели вредных насекомых, их вскрытием и выделением нематод из трупов насекомых. Обследованием почв, с целью выделения инвазионных личинок энтомонематод, исследователи начали заниматься уже после установления циклов их развития, в частности того факта, что почва является основным местом проживания инвазионных личинок этих нематод. Благодаря чрезвычайной пластичности энтомопатогенные нематоды распространены в разнообразных экосистемах, от субарктики до аридных и тропических зон (Glazer, 1996). Представители семейств *Steinernematidae* и *Heterorhabditidae* обнаружены практически в каждой стране, где проводились фаунистические и экологические исследования почвообитающих нематод. Что касается зависимости частоты выделения энтомопатогенных нематод от типов биоценозов, то эти данные достаточно противоречивые. Часть исследователей склоняется к мнению, что энтомонематоды чаще встречаются в необрабатываемых почвах (Hominik, 1990). По мнению других исследователей, энтомопатогенные нематоды – основные обитатели агроценозов (Midutui J.S., 1995). Также достаточно часто они были представлены в посадках деревьев, на улицах, обочинах дорог городов (Mracek, 2003). В одном мнения ученых сходятся – энтомопатогенные нематоды заселяют как природные, так и антропогенные биоценозы.

Информация о распространении энтомопатогенных нематод в биоценозах Украины практически отсутствует, что и стало предусловием наших исследований. Целью нашей работы было выявление энтомонематод в природных биоценозах и агроценозах Украины.

Материалы и методы

Обследования проводили в Киевской, Винницкой, Хмельницкой, Сумской, Запорожской, Николаевской и Закарпатской областях, а также в АР Крым с марта по октябрь 2007–2010 гг.. В полевых условиях пробы почвы отбирали по диагонали поля до глубины 10–15 см, при обследовании садов и древесных декоративных культур – вокруг штамбов отдельных деревьев (по 10 проб на каждое дерево в радиусе 1м) по диагонали посадки. Нематод выделяли в лаборатории из 250 см³ почвы методом «живых ловушек» в полевых и лабораторных условиях, в качестве насекомого-приманки использовали гусениц вошинной моли (*Galleria mellonella*). Мертвых гусениц с признаками нематодного поражения помещали на ловушки Вайта (White, 1927) для выделения инвазионных личинок. Материалы, собранные в областях и в Крыму, анализировали отдельно.

Результаты и обсуждение

По результатам обследования в разных биоценозах упомянутых выше областей общий процент зараженных почвенных проб составлял 22, 6 % (80 зараженных проб из 354). Высокий про-

цент зараженности энтомонематодами показали пробы из грабового леса Киевской области – 40 % от общего числа проб. Сравнение полевых и садовых биоценозов, ореховых и сосновых посадок дало возможность утверждать, что более заселенными энтомонематодами оказались агроценозы. Процент зараженных проб с пахоты достигал 27,9 %, в то время как в садах этот показатель не превышал 17,7 %. Ни одна из 30 проб, отобранных в посадках грецкого ореха и сосновых рассадниках, не содержала нематод.

В полевых агроценозах была исследована 201 почвенная проба, в 56 из них были обнаружены нематоды. Наиболее заселенными энтомонематодами оказались пробы почвы из посадок картофеля и кукурузы (46 и 41,7 % соответственно), менее заселенными – пробы из-под сахарной свеклы (16,7 %). Зараженность энтомопатогенными нематодами полей, занятых под озимым рапсом и капустой, составляла 24,1 и 22,2 соответственно.

Анализ почвенных образцов с яблоневых, абрикосовых, грушевых и персиковых садов, а также посадки смородины показал, что наибольшая частота выявления нематод в почвенных пробах наблюдалась в грушевых садах (54,5 %). В абрикосовых садах энтомонематодами заражены 20 % почвенных проб, в посадке смородины – 13,3 %, а в яблоневых садах этот процент составил всего 9,1 % проб. В пробах из персикового и сливового сада энтомонематоды вообще отсутствовали.

На территории АР Крым исследованиями были охвачены степные и горные районы. С целью обнаружения естественных очагов энтомопатогенных нематод обследования проводили в 2008–2010 гг. в Симферопольском, Сакском, Первомайском, Черноморском и Бахчисарайском районах, а также в Никитском ботаническом саду (ПГТ Никита, г. Ялта), в агроценозах вблизи городов Балаклава и Севастополь. Всего в этом регионе было отобрано 493 почвенных образца. Общий процент заражения по всем биоценозам Крыма за 3 года составил 5,47 %. Аналогичные данные относительно частоты встречаемости получены исследователями в Турции, где из 106 проб из разных районов страны, в т.ч. причерноморского, только 5 содержали энтомогельминтов (Ozer N., 1995).

В Крыму наиболее зараженными оказались сады, нематод содержали 14 проб из 168, или – 8,3 %. В садовых ценозах обследованы насаждения яблони, алычи, абрикоса, груши черешни и персика. Высокая заселенность нематодами наблюдалась в старом черешневом саду поселка Гвардейское Симферопольского района, где заражение энтомонематодами достигало 60 %. Персиковый сад был заселен представителями рода *Steinernema*, остальные культуры заселяли *Heterorhabditis*.

На виноградниках обследовали как промышленные, с традиционной системой защиты, так и заброшенные насаждения. Гетерорабдитисы были обнаружены в промышленных виноградниках в 4 из 60 (6,7 %) почвенных образцов.

Из естественных ценозов были обследованы садово-парковые растительные ассоциации, луговые и лесные ценозы, а также насаждения можжевельника, лаврового дерева, олеандра, разных видов хризантем и роз. Природные популяции гетерорабдитид выявлены в дендропарке г. Евпатория, в розарии Симферопольского ботсада, а также в насаждениях хризантем Никитского ботанического сада. Процент заражения естественных ценозов, а также насаждений декоративных культур не превышал 4,57 %.

Почвенные пробы, отобранные под сорго, подсолнечником, кукурузой и лесными культурами, не содержали нематод. Следует отметить, что в некоторых других регионах мира энтомонематоды также преобладали в садовых агроценозах и не обнаруживались в пробах с пашни (Hominik, 1990).

Что касается видового состава энтомонематод, то в биоценозах Лесостепи, Полесья и зоны Карпат Украины преобладали представители рода *Steinernema*, они выявлены в 97,5 % всех зараженных проб. В Крыму же, наоборот, преобладали представители рода *Heterorhabditis*, обнаруженные в 21 из 27 зараженных проб.

Литература

Sigareva D.D. Natural distribution of entomopathogenic nematodes Steinernematidae in the orchard, forest and field Biocenosis of Central Forest-Steppe of Ukraine // Sigareva D.D., Olenenko V.V., Gratsianova N.V. / Интегрированная защита садов и виноградников. Международная конференция МОБ. – 2008

Glazer I. Survival mechanisms of entomopathogenic nematode / I. Glazer // Biocontr. Sci. and Technol. – 1996. – Т.6, .3. – С. 373–378.

- Hominik W.M. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in British soils / W.M. Hominik, B.R. Briscoe // *Parasitology*. – 1990. – Т.100, 2. – С. 295–302.
- Midutui J.S. Occurrence of entomopathogenic nematodes in the West-Vlaanderen province of Belgium / J.S. Midutui, M. Moens., A. Grisse : Abstr. [22 nd Int. Symp. Eur. Soc. Nematol.], (Ghent, 7–12 Aug.1994) // *Nematologica*. – 1995. – О.41, . 3. – N. 322.
- Mracek Z. Steinernema weiseri n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe / Z. Mracek, D. Sturhan, A. Reid // *Syst. Parasitol.* – 2003. – Т. 56, . 1. – N. 37–47.
- White G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures / G.F. White // *Science*. – 1927, .66. – P. 302–303.
- Ozer N. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Heterorhabditidae) in Turkey / N. Ozer, N.Keskin, Z.Kirbas // *Nematologica*. – 1995. – О.41, 5. – N. 639–640.

ПОЛИМОРФИЗМ ITS-УЧАСТКА РИБОСОМАЛЬНОЙ ДНК ПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД: ПОСЛЕДСТВИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

С. Э. Спиридонов, А. П. Аксенов

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова, Ленинский пр., 33, Москва, 119071, Россия,
s_e_spiridonov@rambler.ru*

Различия в нуклеотидном составе рибосомальных последовательностей в пределах одного вида, а иногда и одной особи паразитических нематод были выявлены уже в самом начале молекулярно-филогенетических исследований (Blouin *et al.*, 1992, Dame *et al.*, 1991). Позднее такой полиморфизм рибосомальных последовательностей был показан и для почвенных энтомопатогенных нематод (Spiridonov *et al.*, 2004). Нередко вариабельность на уровне вида и даже особи выявляется в последовательностях внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальной ДНК (ITS rDNA). Эти последовательности часто используются для разграничения близких видов нематод и выявления внутривидовых групп. Полиморфизм создает определенные неудобства, поскольку ПЦР-продукты, полученные при амплификации ДНК таких особей, не могут быть использованы для прямого секвенирования, так что приходится клонировать ПЦР-продукты. В то же время эта вариабельность оказывается дополнительным ценным инструментом для познания эволюционной истории вида. Такой полиморфизм является отражением взаимодействия различных факторов и процессов. Мутации в спейсерных последовательностях не подвергаются столь же жесткому отбору как домены 18S или 5.8S. В то же время отмечены случаи компенсаторных мутаций в ITS-участке, что, по-видимому, связано с необходимостью сохранения вторичной структуры формирующейся молекулы РНК. Известны также генетические механизмы, выравнивающие вариабельность по этим доменам в пределах популяции (Hillis, Dixon, 1991).

Материал и методы

В качестве пробы для проведения ПЦР использовали ДНК извлеченную из единственных особей нематод. Для этого использовали разные методы, в том числе метод с использованием протеиназы К или NaOH, и, в случае более крупных дирофилярий – колонки Wizard® DNA Clean-Up System фирмы Promega. Использовали предложенные для использования на нематодах Дж. Карраном праймеры TW81 и AB28. Лигацию и клонирование ПЦР-продуктов проводили по прописи фирмы Promega с помощью набора pGEM®-T Vector System II. Не менее 5-и белых (трансформированных) колоний использовалась для постановки ПЦР с векторными праймерами T7 и SP6. Полученный продукт этой реакции очищали и использовали для секвенирования с векторными и первоначальным праймерами. Для сравнительного анализа использовали последовательности, депонированные для соответствующих видов в ГенБанке (NCBI GenBank).

Результаты

Филогенетический анализ полученных последовательностей ITS rDNA *Haemonchus contortus* выявил существование нуклеотидных различий между отдельными клонами. Один из гаплотипов был почти идентичен (различие в одной паре нуклеотидов) последовательности *H. contortus* от овцы из пров. Внутренняя Монголия Китая. По некоторым позициям отдельные клоны отличались от других, но показывали сходство с ITS rDNA-последовательностями этого вида, выявленными в других географических точках. Так клон 2 по нескольким позициям был сходен с последовательностью *H. contortus* из Индии (Рис. 1).