

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЗООЛОГІЇ ІМ. І. І. ШМАЛЬГАУЗЕНА**

ЯКОВЛЄВ ЄГОР БОРИСОВИЧ



УДК 591.619(595.7):(1-751.3)(477)

**ЕНТОМОПАТОГЕННІ НЕМАТОДИ (NEMATODA, RHABDITIDA)
В ПРИРОДНИХ ЕКОСИСТЕМАХ УКРАЇНИ**

03.00.25 – Паразитологія, гельмінтологія

**АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі паразитології
Інституту зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України (м. Київ)

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, габілітований доктор біологічних наук (Республіка Польща)
Харченко Віталій Олександрович
Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України
завідувач відділу паразитології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Пилипенко Лілія Амінівна
Відділення землеробства, механізації та меліорації
Національна академія аграрних наук України
заступник академіка-секретаря

габілітований доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Овчаренко Микола Олександрович
Інститут біології та охорони середовища Поморської Академії, Республіка Польща
професор

Захист відбудеться «05» грудня 2017 р. об 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.153.01 Інституту зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Б. Хмельницького, 15.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Б. Хмельницького, 15.

Автореферат розісланий «03» листопада 2017 р.

**Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради**



Ю. К. Куцоконь

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Одним із перспективних напрямків використання біометодів контролю комах-шкідників агрокультур у відкритому та закритому ґрунтах є впровадження препаратів на основі ентомопатогенних нематод (ЕПН) родин *Steinernematidae* та *Heterorhabditidae*: вони з високою ефективністю уражують широкий спектр комах, абсолютно безпечні для хребетних тварин та безпечні для колоній суспільних комах.

Важливою умовою успішного впровадження ентомопатогенних нематод в якості агентів біометоду є вивчення різноманіття місцевих, адаптованих до своїх природних ареалів, видів і ізолятів ентомопатогенних нематод. Беручи до уваги їх морфологічну подібність, коректно це можливо зробити використовуючи не лише морфологічні, а й молекулярно-генетичні методи ідентифікації окремих видів, популяцій та ізолятів. Лишається погано вивченою ефективність використання нематодами поживного ресурсу комах-хазяїна, оскільки це впливає на практичний вихід інвазійних личинок та ефективність поширення паразитоїдів в зовнішньому середовищі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами.

Дисертаційна робота виконана в рамках теми відділу паразитології «Паразитарні системи фонових груп тварин, їх біорізноманіття і структура залежно від тривалих змін довкілля; ревізія видового складу, систематики практично важливих таксонів паразитів фауни України» (державний реєстраційний номер 0111U000150), програми академічного обміну КОНТАКТ II (проект LH 12105) та проекту “Soil biota biodiversity in the Antarctic terrestrial ecosystems”.

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи – дослідити різноманіття ентомопатогенних нематод в екосистемах зі зниженим антропогенним впливом в складі природно-заповідного фонду та проаналізувати їх поширення порівняно з агроценозами України. Для досягнення цієї мети нами були поставлені наступні завдання:

1. Виділити з природних осередків та накопичити шляхом культивування ентомопатогенні нематоди.
2. Визначити видову належність накопичених ентомопатогенних нематод.
3. Встановити залежність поширення ентомопатогенних нематод від умов навколишнього середовища.
4. Порівняти заселеність ентомопатогенними нематодами природних екосистем та агроценозів.

Об'єкт дослідження – ентомопатогенні нематоди природно-заповідного фонду України.

Предмет дослідження – видовий склад ентомопатогенних нематод природно-заповідного фонду України; морфологічна характеристика окремих ізолятів ентомопатогенних нематод; послідовності нуклеотидів рДНК нематод родини *Steinernematidae*.

Методи дослідження. Морфологію ентомопатогенних нематод досліджували методами світлової мікроскопії з використанням диференційно-інтерференційного контрасту (ДІК) на мікроскопі Carl Zeiss AxioImager M1; життєві цикли ЕПН –

методами лабораторного культивування вільноживучих та паразитичних стадій нематод, культивування тест-комах, експериментального зараження тест-комах. Послідовності нуклеотидів рДНК *Steinernematidae* досліджували методами ампліфікації та сіквенсування ДНК.

Наукова новизна. Вперше в Україні проведено систематичне комплексне дослідження фауни ентомопатогенних нематод в екосистемах зі зниженим антропогенним впливом. Отримано дані про географічну структуру природних мікропопуляцій ентомопатогенних нематод України.

Вперше проведено молекулярно-генетичне дослідження виділених з території України ізолятів видів ентомопатогенних нематод (ЕПН) з роду *Steinernema*. Ідентифіковано види *Steinernema arenarium* (2 ізоляти) та *S. feltiae* (10 ізолятів). Вид *S. arenarium* зареєстрований в Україні вперше. Ще один ізолят, *Steinernema* sp. (ідентифікувати який до виду поки не вдалося) було знайдено на території біологічної станції в околицях с. Колочава (Закарпатська область).

Експериментальним шляхом встановлено, що ентомопатогенні нематоди вказаних видів виявляють, окрім генетичного поліморфізму, значну морфологічну мінливість (утворення «пігмейних» (“pygmy”) поколінь, варіювання морфометричних параметрів) в залежності від дії абіотичних та біотичних факторів, що ускладнює процес ідентифікації окремих видів. Для виду *S. arenarium* «пігмейні» особини зареєстровані вперше.

Практичне значення одержаних результатів. Загальноприйнято, що місцеві ізоляти ЕПН мають сильніший вплив на місцеві популяції комах-шкідників. Також, вони краще пристосовані до умов, у яких препарати на основі ЕПН будуть застосовуватись.

Виявлення морфологічної мінливості в залежності від змін абіотичних факторів може бути застосоване для пошуку нових методів діагностування та диференціювання видів, оскільки стандартні морфологічні методики наразі втрачають свою актуальність без застосування у комплексі з молекулярно-генетичними методами. При розробці препаратів на основі ЕПН важливо враховувати мінливість нематод оскільки це може впливати на характер використання ними поживних речовин, інвазивність личинок, вихід dauer-личинок при виробництві препаратів.

Особистий внесок здобувача. Збір матеріалу, культивування ентомопатогенних нематод, дослідження морфології та морфометрія проведені особисто автором. Виділення ДНК, ампліфікація та очищення продуктів ПЛР проведені особисто автором та у співпраці з В. Пужею, І. Нермудем (Інститут ентомології, Біологічний Центр АН Чеської Республіки), Н. Яковенко (Природознавчий факультет, Остравський університет, Чеська Республіка).

Апробація результатів дисертації. Матеріали досліджень за темою дисертації були представлені на конференціях: Конференція молодих дослідників-зоологів (Київ, 08-09 квітня 2009 р.); XIV Міжнародна наукова конференція «Інформаційні технології в економіці, менеджменті і бізнесі. Проблеми науки, практики і освіти» (Київ, 27 листопада 2009 р.); Зоологічна наука у сучасному суспільстві: Матеріали Всеукраїнської наукової конференції, присвячені 175-річчю

заснування кафедри зоології. (Київ, 2009); XIV Конференція Українського наукового товариства паразитологів (Ужгород, 21-24 вересня 2009 р.); Конференція молодих дослідників-зоологів (Київ, 18-19 квітня 2012 р.); XV Конференція Українського наукового товариства паразитологів (Чернівці, 15-18 жовтня 2013 р.); Харківські зоологічні читання пам'яті професора Юхима Лукина (Харків, 6-10 жовтня 2014 р.).

Публікації. В результаті проведеної дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць, з них: 5 наукових статей у фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженому ДАК, 1 тезова робота та 6 публікацій у матеріалах конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, чотирьох розділів, висновків, списку літератури та додатків. Тексту передуює список умовних скорочень. Робота викладена на 131 сторінці та ілюстрована 32 рисунками і містить 20 таблиць та 3 додатки. Список літератури включає 139 джерел, з них 20 кирилицею.

Подяки. Автор висловлює подяку своєму науковому керівнику, к.б.н., док. габ. В. О. Харченку, член.-кор. НААН України, проф., д.б.н. Д. Д. Сігарьовій, співробітникам відділу паразитології, колегам з Інституту зоології, колегам з Лабораторії вивчення ентомопатогенних нематод АН Чеської Республіки, співробітникам дружніх організацій, рідним, близьким та дружині за розуміння, підтримку та допомогу в написанні та підготовці дисертації.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі викладено історію дослідження ентомопатогенних нематод родин *Steinernematidae* та *Heterorhabditidae* (Nematoda, *Panagrolaimida/Rhabditida et Rhabditida*) а також літературні дані про біологію, філогенію, особливості їх морфології і життєвих циклів, та перспективи подальшого вивчення.

Традиційно, ентомопатогенних нематод обох родин відносять до класу *Chromadorea*; надряду *Rhabditica*; ряду *Rhabditida*. Проте, на основі даних останніх молекулярно-генетичних досліджень, деякі дослідники виділяють родину *Steinernematidae* до ряду *Panagrolaimida*; підряду *Panagrolaimina* (Hodda, 2011).

До складу родини *Steinernematidae* входять два роди: *Steinernema* (88 видів) та *Neosteinernema* Nguyen, Smart, Jr., 1994 (1 вид, – *N. longicurvicaudum* Nguyen, Smart, Jr., 1994 (Nguyen and Smart, 1994)). До родини *Heterorhabditidae* належать 2 роди: *Heterorhabditis* – 20 видів та *Heterorhabditidoides* Zhang, 2008 (2 види – *H. chongmingensis* Zhang, 2008 та *H. rugaoensis* Zhang, Liu, Tan, Wang, Qiao, Yedid, Dai, Qiu, Yan, Tan, Su, Lai et Gao, 2012).

У 1923 році Г. Штайнер (Steiner, 1923) описав паразитичних нематод, виділених Краусом з імаго пильщика *Lyda* sp. (пізніше, Г. Штайнер отримав особисте повідомлення від Краусса, що даний вид пильщика є *Lyda hypotrophica* Hartig (= *Cephaleia abietis* L.) (Schimitschek, 1950)), з ряду *Rhabditida* – *Aplectana kraussei* Steiner, 1923. У 1927 році Л. Травассос, взявши до уваги цілковито інший,

ентомопаразитичний, спосіб існування цих нематод виділив їх з роду *Aplectana* Railliet & Henry, 1916, які паразитують у шлунково-кишковому тракті амфібій та рептилій, у рід *Steinernema* Travassos, 1927 (Travassos, 1927). 1955 року Й. Уейзер та С. Даткі і В. Хью у Чехословаччині одночасно виділили *Neoaplectana carpocapsae* (Weiser, 1955) та довели наявність симбіонтних зв'язків між ЕПН та асоційованими з ними бактеріями родини Enterobacteriaceae (Dutky та Hough, 1955; Weiser, 1955). На основі детального дослідження морфології з застосуванням скануючої електронної мікроскопії роди вони об'єднали *Steinernema* та *Neoaplectana* в один рід.

Г. Пойнар у 1976 році виділив нову родину Heterorhabditidae з єдиним родом *Heterorhabditis*, на основі описаного з *Heliothis punctigera* Hall. виду *H. bacteriophora*. До складу нового роду був включений виділений з довгоносику *Gasterocercodes brasiliensis* Hambleton, 1937 (сучасна назва *Eutinobothrus brasiliensis* (Hambleton, 1937)) вид *Rhabditis hambletoni* Pereira, 1937 (Pereira, 1937). Описаний того ж року новий вид *Chromonema heliothidis* Khan, Brooks & Hirschmann, 1976 (Khan, Brooks та Hirschmann, 1976) у складі нового ж роду був синонімізований з *H. bacteriophora* 1977 року (Poinar, Thomas та Hess, 1977).

На території Радянського Союзу протягом 1950-70 рр. велися роботи з дослідження нематод, що уражують шкідливих видів комах в агроценозах. 1955 року К. С. Кірьяною та Л. В. Пучковою був описаний новий вид ЕПН, *Neoaplectana bothynoderi* Kirjanova et Putschkova, 1955, зібраний на буряковому довгоносику *Bothynoderes punctiventris* Germ. в Полтавській області УРСР (зараз sp. inquirenda) (Кірьянова та Пучкова, 1955). В Ленінградській (РРФСР) та Мінській областях (БРСР) Галиною Веремчук було виділено нові види ЕПН, на жаль, недостатньо описані, через що їм пізніше було надано статус species inquirendae: *N. belorussica* Veremchuk, 1969, *N. kirjanovae* Veremchuk, 1969, *N. agriotos*, Veremchuk, 1969 (Веремчук, 1969). Сьогодні ці види відносять до морф *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) та *S. feltiae* Filipjev, 1934 (Nguyen та Hunt, 2007).

На території України робота за даною тематикою відновилася у Національному аграрному університеті та на базі Лабораторії нематології Інституту захисту рослин УААН. У 2007 році з ґрунтів плодівих садів з Центрального Лісостепу України Стефановською Т. Р. (Стефановська, 2007) виділено та діагностовано за результатами молекулярного аналізу *H. bacteriophora* Poinar, 1975. Згідно з дослідженнями, проведеними в Лабораторії нематології ІЗР УААН, на території України зустрічаються *S. feltiae*, *S. carpocapsae* та *H. bacteriophora*. Проте, в останньому випадку молекулярна діагностика не проводилась (Олененко та Сигарєва, 2009; Сигарєва та Олененко, 2008; Сигарьова та ін., 2009; Яковлев та Олененко, 2009; Sigareva, Olenenko та Gratsianova, 2008).

В розділі охарактеризовано основні особливості каріотипу ЕПН та гени, придатні для філогенетичних досліджень. На основі дослідження нуклеотидного складу НТД I–5,8 S–НТД II відрізка рДНК (Spiridonov та ін., 2004), та аналізу відмінностей його складу у ізолятів з різних вибірок, деякими авторами родину Steinernematidae було поділено на 5 клад:

1. група “*affine-intermedium*”;
2. група “*carpocapsae-scapteriski-tami*”;

3. група “*feltiae-kraussei-oregonense*”;
4. група “*bicornutum-ceratophorum-riobrave*”;
5. група “*arenarium-glaseri-karii-longicaudum*”.

Також в розділі висвітлено перспективи подальшого вивчення ЕПН України з урахуванням переваг використання біологічного методу захисту рослин.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Територія проведення досліджень. Протягом 2009-2014 років на території України було зібрано 434 ґрунтових проб з 14 заповідників (Карпатського Біосферного заповідника (БЗ) (Закарпатська обл.); БЗ «Асканія-Нова» та Чорноморського БЗ (Херсонська обл.); Казантипського природного заповідника (ПЗ), Карадазького ПЗ та Кримського ПЗ (АР Крим); Українського Степового ПЗ (Донецька та Запорізька обл.); Дніпровсько-Орільського ПЗ (Дніпропетровська обл.); Канівського ПЗ (Черкаська обл.); Рівненського ПЗ (Рівненська обл.); Черемського ПЗ (Волинська обл.); ПЗ «Горгани» (Івано-Франківська обл.); ПЗ «Медобори» (Тернопільська обл.), ПЗ «Єланецький степ» (Миколаївська обл.)), шістьох національних природних парків (Голосіївського (Київська обл.); Ужанського (Закарпатська обл.); НПП «Сколівські бескиди» (Львівська обл.); НПП «Великий Луг» (Запорізька обл.); НПП «Кармелюкове Поділля» (Вінницька обл.); Пирятинського НПП (Полтавська обл.);), Міжрічинського регіонального ландшафтного парку (Чернігівська обл.) та Чорнобильської зони відчуження (Київська обл.), біологічної бази (Ужгородський Національний університет) з околиць с. Колочава (Закарпатська обл.).

Фізико-географічна характеристика району досліджень. В підрозділі охарактеризовано загалом кліматичні та географічні умови та стан різноманіття фітоценозів і ґрунтів лісостепової та степової зон, зони мішаних лісів, Українських Карпат та Кримських гір (викладено за Маринич, Пашенко та Шищенко, 1985).

Відбір проб. Ґрунтові проби для досліджень об’ємом 250-300 см³ було відібрано методом безпосереднього відбору проб з глибини 5-10 см від поверхні (Bedding and Akhurst, 1975, Марчук та Савчук, 2008).

Виявлення інвазійних личинок ентомопатогенних нематод в лабораторних умовах. В лабораторних умовах з проби ґрунту видаляли каміння, торф та рештки коріння і вміщували до тари об’ємом 250 см³. Нематод виділяли за допомогою модифікації методу ґрунтових пасток (Данилов, 2005): для цього личинок обраного виду тест-комах вміщували у сітчасту капсулу (виготовленої з верхньої частини мікропробірки об’ємом 1,5 мл та нержавіючої металевої сітки) та вкладали у тару.

Проби експонували 5 днів та перевіряли на зараження. Личинок тест-комах з явними ознаками нематодного ураження відмивали 10-15 секунд у 70 % етиловому спирті та переносили на пастки Уайта. Пастки Уайта витримували за кімнатної температури в темному приміщенні, або при розсіяному світлі. Контамінацію грибками обов’язково усували шляхом механічної або хімічної обробки.

Після початку міграції нематод зливали разом з розчином у окремий посуд, де зберігали, підтримуючи постійний рівень розчину та з періодичним очищенням від

загиблих личинок, за температури 4 °С, до півроку; у чашки Петрі доливали новий 0,001%-ний розчин формаліну у фізіологічному розчині.

Культивування тест-комах. В якості тест-комах використовували личинок великої воскової молі *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) та великого мучного хрущака *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Стефановська, 2007). Для розведення воскової молі використовували термостати з температурою в робочій камері 38 °С, для вигодовування личинок використовували спеціальні суміші (Meyling, 2007).

Культивування ентомопатогенних нематод. Отримані культури ЕПН розмножували на личинках тест-комах. Анестезованих холодом тест-комах обприскували суспензією нематод з відомою кількістю інвазійних личинок (ІЛ) для досягнення концентрації 100 ІЛ/комахи в попередньо простерилізованих чашках Петрі з сухим фільтрувальним папером та витримували при 22-25 °С до евазії інвазійних личинок (Веремчук, 1972).

Фіксація матеріалу та виготовлення препаратів. Для дослідження морфології та вимірювання морфометричних параметрів використовували тимчасові та постійні препарати нематод. Для виготовлення тимчасових препаратів ЕПН, живих нематод вміщували у краплю розчину Рінгера для комах на предметному скельці, накривали покривним скельцем та витримували препарат при 65-70°С протягом 7-10 секунд, до повного знерухомлення об'єктів (Nguyen та Hunt, 2007).

Для виготовлення постійних препаратів ЕПН, нематод фіксували у нагрітому до 65-70°С одинарному ТАФ або нагрітому до 60-65°С 70 % етиловому спирті, оскільки нематоди, фіксовані в ТАФ для подальших генетичних досліджень не придатні. Після цього, нематод відмивали у дистильованій воді та, за методом Зайнхорста (Seinhorst, 1959) або за спрощеною схемою (Рубцов, 1978), переводили до розчину гліцерину у воді у співвідношенні 1:2 з додаванням кількох кристалів фенолу на 15 мл розчину. В краплину розчину на обезжиреному предметному склі поміщали нематод, накривали покривним скельцем та закривали лаком.

Дослідження морфології та морфометрія. Вимірювання нематод виконували за допомогою об'єкт-мікрометра, встановленого на мікроскопах PZO MPI-5, Amplival Carl Zeiss Jena. Усі параметри вимірювали на збільшенні $\times 200-500$. Рисунки нематод виконували у програмі Adobe Photoshop CS3-CS6 за фотографіями на різних налаштуваннях різкості з використанням стекінгу та за допомогою рисувального апарату PA-7. Для отримання мікрофотографій використовували мікроскоп Axio Imager M1 Carl Zeiss з функцією диференційно-інтерференційного контрасту (ДІК). ЕПН вимірювали згідно з загальноприйнятими методиками (De Man, 1876, De Man, 1880, Weiser and Köhler, 1955, Nguyen та Hunt, 2007).

У нематод вимірювали такі параметри: L – загальна довжина тіла; W – діаметр тулуба; T – довжина хвоста, що вимірюється як відстань кінця хвоста до анального отвору; ES – загальна довжина стравоходу; NR – відстань від головного кінця до нервового кільця; EP – відстань від головного кінця до видільної (екскреторної) пори; Нуа – довжина гіалінового кінця хвоста інвазійних личинок; GL – довжина губернакулуму (♂); SL – довжина спікул (♂); CBD – діаметр тіла на рівні клоаки (♂); ABD – діаметр тіла на рівні анусу (ІЛ та ♀); V – дистанція від апікального кінця до вульви (♀). На основі даних морфометричних показників вираховували індекси де

Мана та коефіцієнти: $a=L/W$; $b=L/ES$; $c=L/T$; $D\%=EP/ES\times 100$; $E\%=EP/T\times 100$; $GS\%=GL/SL\times 100$, $SW\%=SL/CBD\times 100$; $V\%=V/L\times 100$.

Статистична обробка даних. Для статистичної обробки отриманих морфометричних даних та вирахування коефіцієнтів використовували модуль «Block data stats» програми Statistica v. 10 (StatSoft, Inc., 2011). Для показників та коефіцієнтів вираховували середнє, середнє квадратичне відхилення (СКВ), мінімальне та максимальне значення. На основі отриманих морфометричних параметрів було проведено кореляційний аналіз канонічних змінних номінальних параметрів з модуля «Discriminant Function Analysis» програми Statistica (StatSoft, Inc.). Для канонічних коренів із найбільшою значимістю було побудовано графіки канонічних кореляцій.

ПЛР. Екстракція ДНК. Електрофорез у гелі. Для молекулярно-генетичного аналізу використовували ІЛ або самиць (F1 або F2) ентомопатогенних нематод, суправітально, або зафіксованих у 96 %-ному етиловому спирті. Екстракцію ДНК, ПЛР та електрофорез у гелі проводили за загальноприйнятими методиками (Nguyen та Hunt, 2007). Для сіквенсування зразків було застосовано послуги фірми Macrogen Inc. та SeqMe.

Обробка результатів сіквенсування. BLAST. Отримані після сіквенсування хроматограми обробляли вручну за допомогою програми Chromatogram Explorer v.3.3.0, для кожного ізоляту пряму та реверсну послідовності ДНК об'єднували та вручну виправляли за допомогою програм BioEdit (Hall, 1999) та DNA Baser v.4.16.0 (2014b). Вирівнення об'єднаних послідовностей нуклеотидів (сіквенсів) виконували за допомогою програми ClustalW (Thompson *та ін.*, 1994), шляхом повного множинного вирівнення. Сіквенси ДНК обробляли за допомогою програмного онлайн-пакету BLAST з алгоритмом пошуку максимальної подібності Megablast (Morgulis *та ін.*, 2008). Для виявлення філогенетичних зв'язків використано програму MrBayes v.3.2.2 (Ronquist *та ін.*, 2011), філогенетичне дерево візуалізували за допомогою програми TreeView (Page, 1996). Також, для вирівнювання сіквенсів та проведення філогенетичного аналізу використано програму MEGA версії 6 (Tamura *та ін.*, 2013).

ВИЯВЛЕНІ ІЗОЛЯТИ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ НЕМАТОД

На досліджуваній території було виявлено 13 проб з ознаками ураження тест-комах ентомопатогенними нематодами. З заражених тест-комах було виділено 13 ізолятів ЕПН (виявлених на основі географічного положення суб-популяцій ентомопатогенних нематод), що складає 3 % від загальної кількості зібраних проб. ЕПН виділено з Закарпатської, Київської, Черкаської, Херсонської, Запорізької областей та АР Крим (Рис. 1).

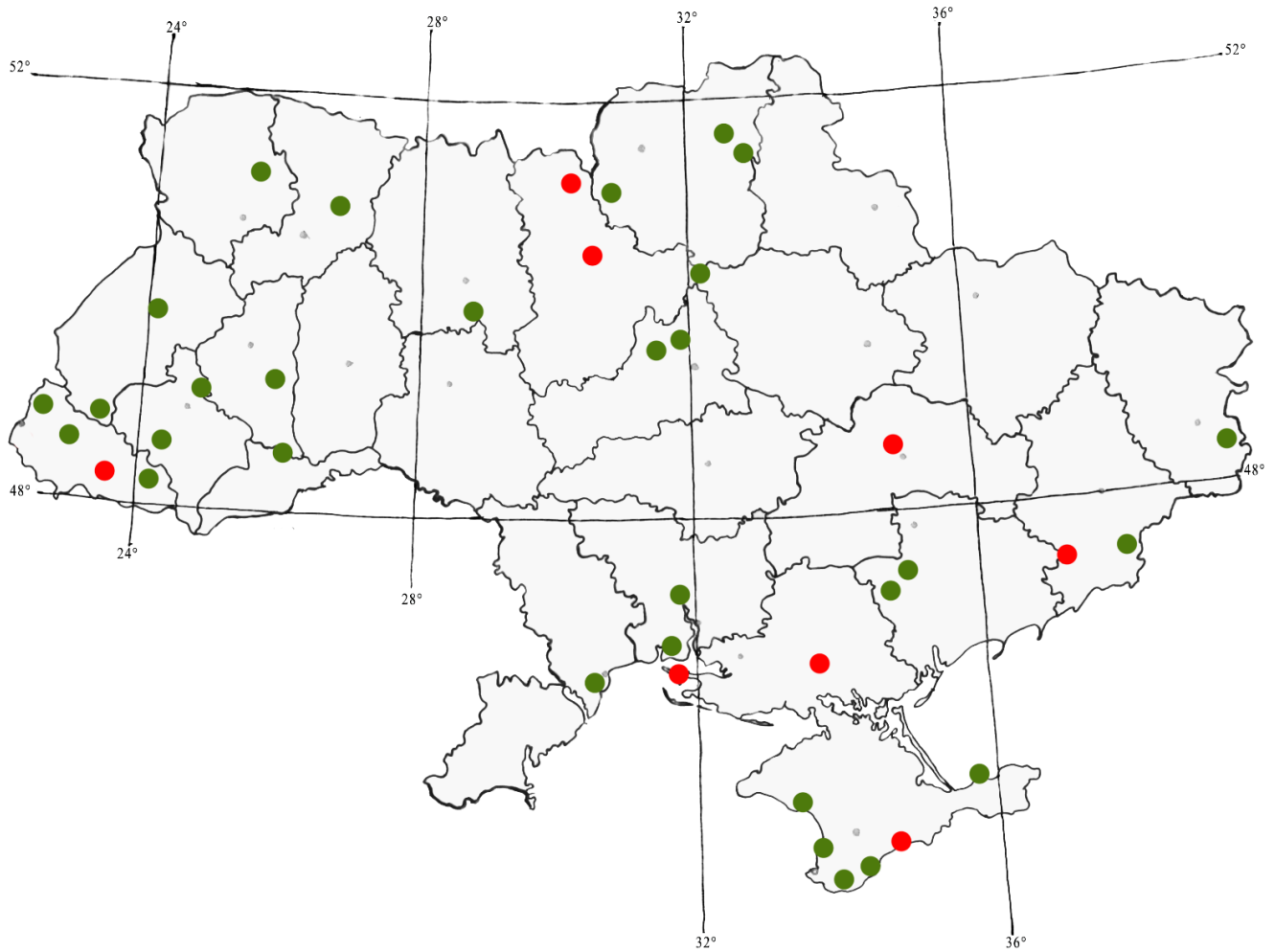


Рис. 1. Точки відбору проб ґрунту. Червоним кольором позначені точки з позитивними на ЕПН зразками, зеленим – без виявлення ЕПН. (Оригінал).

Виділені ізоляти було ідентифіковано як види роду *Steinernema*. А саме:

***Steinernema arenarium* (Artyukhovsky, 1967) Wouts *ma in.*, 1982**

Поширення:

Ізолят СН: було виявлено на території Чорнобильської зони відчуження ЧАЕС в зоні періодичного радіологічного контролю. Координати знахідки: 55.186300N; 30.049567E.

Ізолят ІР: було виявлено на території Івано-Рибальчанської ділянки Чорноморського Біосферного заповіднику Херсонської області (проба С-1-1). Координати знахідки: 46.449167N; 32.139167E.

Молекулярно-генетичний аналіз. Аналіз отриманих сіквенсів за допомогою програми BLAST показав подібність ізоляту ІР до *S. arenarium* штаму Rjazan з номером доступу AY230160.1 на 96 % (Query coverage 73 %, E-value 8e-52). В ГенБанку (Benson *ma in.*, 2014) ізоляту ІР надано номер доступу KF939327.

В ГенБанку клонам ізоляту СН було надано номери доступу KR058346, KR058347, KR058348 та KR058349.

В обох ізолятах було виявлено генний поліморфізм по сіквенсованому гену. На основі отриманих сіквенсів було проведено аналіз філогенетичних відносин між ізолятами даного виду з ізолятами, виділеними з території Європи, Марокко та Палестини (Рис. 2). Загальна середня відмінність між сіквенсами відрізка ITS ізолятів виду склала у максимумі 3,9% та відрізка D2-D3 – до 1,0 %. Відповідно проведеному аналізу усі виявлені ізоляти виду належать до однієї монофілетичної

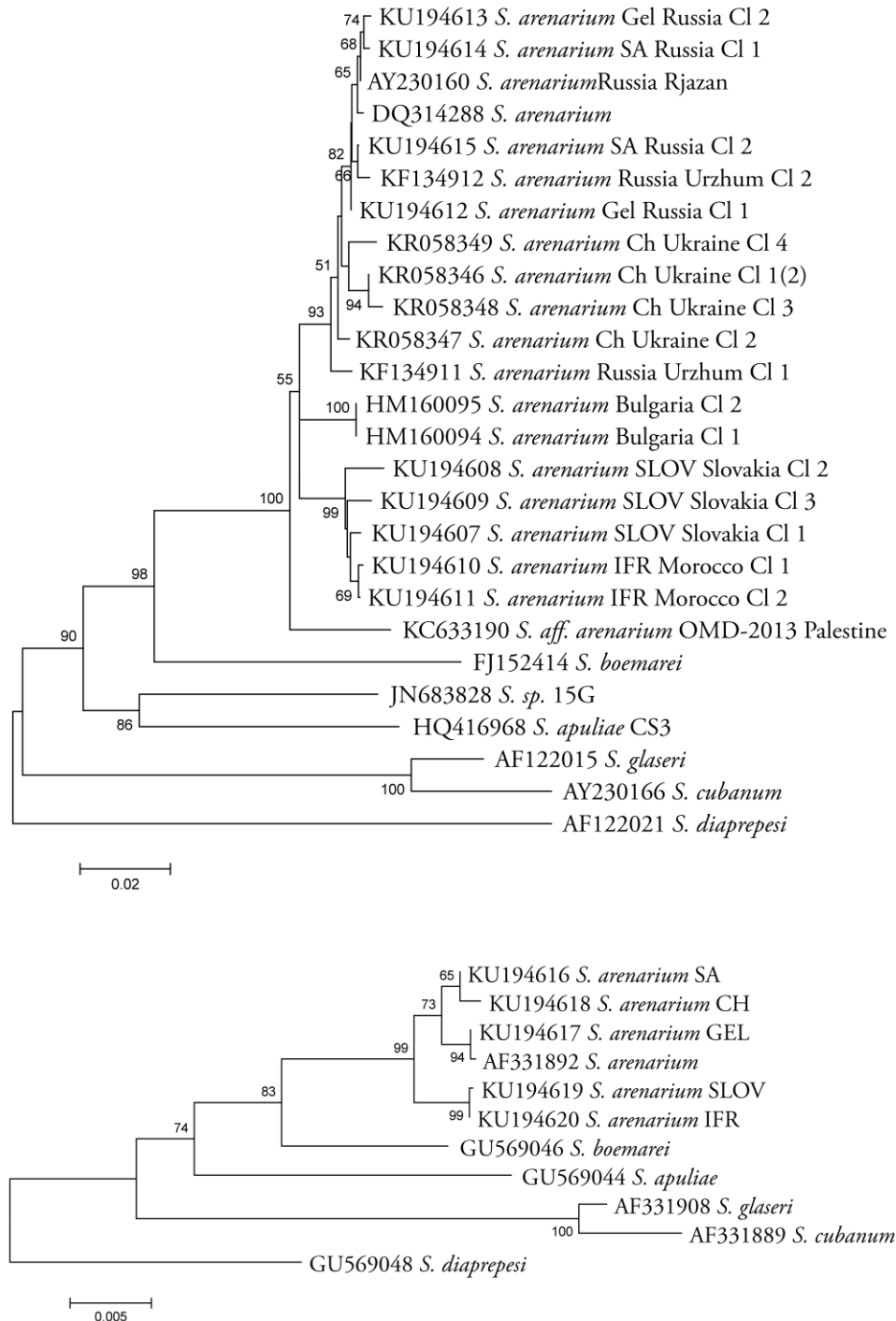


Рис. 2. Філогенетичні відносини між ізолятами *S. arenarium* на основі аналізу сіквенсів ділянки ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (А) та ділянки D2-D3 28S рДНК (Б). В якості зовнішньої групи використано ізоляти видів *S. apuliae*, *S. boemarei*, *S. cubanum*, *S. diaprepesi* та *S. glaseri*. Кількість генерацій 10000.

групи, з двома вираженими географічнимикладами: Україна та Росія; Словаччина та Марокко. На дереві ITS1-5.8S-ITS2 присутня третяклада, представлена ізолятами з Болгарії, в основі дерева *S. arenarium* знаходиться ізолят з Палестини. Ізоляти виду *S. arenarium* з України демонструють широке розповсюдження виду по території країни (відстань між точками виявлення ізолятів складає більше 500 км).

Українські ізоляти даного виду мають певні регіональні особливості. Обидва ізоляти мають менші морфометричні параметри (до 37 % різниці) усіх стадій розвитку, ніж оригінально описані з Воронезької та Рязанської областей нинішньої території Російської Федерації: дорослі особини обох ізолятів коротші; самці ізоляту СН мають менший G/S% індекс, ізоляту IR, – більший; самці другої генерації порівняно з раніше опублікованими даними, мають напівпомітний мукральний шип на хвостовому кінці, а у самиць першої генерації у вульві присутня помітна епіптігма.

***Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts *ma in.*, 1982**

Поширення: Виявлені в Дніпровсько-Орільському природному заповіднику (ізолят DONR), координати знахідки 48.510521N, 34.806957E; філії «Кам'яні могили» Українського Степового природного заповідника (ізолят КМ), координати знахідки 47.307634N, 37.080346E; Карадазькому природному заповіднику (ізоляти Kar-4, Kar-13), координати знахідки 49.714969N, 31.468431E; біосферному заповіднику «Асканія-Нова» (ізоляти Ask-6-2 (46.459283N 33.902233E), Ask-12 (46.451767N 33.934533E)); Канівському природному заповіднику (ізолят Kan), координати знахідки 49.2328N 31.3133E; Національному природному парку «Голосіївський» (ізоляти Gol-2 (50.360533N 30.454400E), Gol-3 (50.360850N 30.455383E), Gol-7 (50.369000N 30.475667E).

Молекулярно-генетичний аналіз. Аналіз отриманих сіквенсів за допомогою програми BLAST показав подібність 98-99% (Query coverage 84-95%, E-value 0.00) до *S. feltiae* штам HkEr36 з номером доступу AB243439.1.

В ГенБанку ізолятам DONR, Kar-4, Kar-13, КМ було надано номери доступу KF939328.1-KF939331.1.

Сіквенси, які мали ідентичність з зовнішньою групою більше 42% було використано побудови філогенетичного дерева, що відображає зв'язки в групі виділених на території України ізолятів *S. feltiae* (Рис. 3).

Побудоване дерево свідчить про поліфілію знайдених у Україні ізолятів ЕПН. Поліморфізм по сіквенсованій ділянці рДНК виключає можливість філогенічного тлумачення географічного поширення виду на території України.

Загальна відмінність сіквенсів деяких ізолятів складає до 10,1 %, що значно перевищує поріг у 95 %, запропонований Нгуєном та іншими (2007) і говорить про необхідність використання для побудови адекватного філогенетичного дерева сучасніших молекулярно-генетичних методів дослідження, зокрема клонування даної ділянки рДНК.

***Steinernema* sp. ізолят U2**

Поширення: було виявлено в околицях с. Колочава Закарпатської області (проба U2).

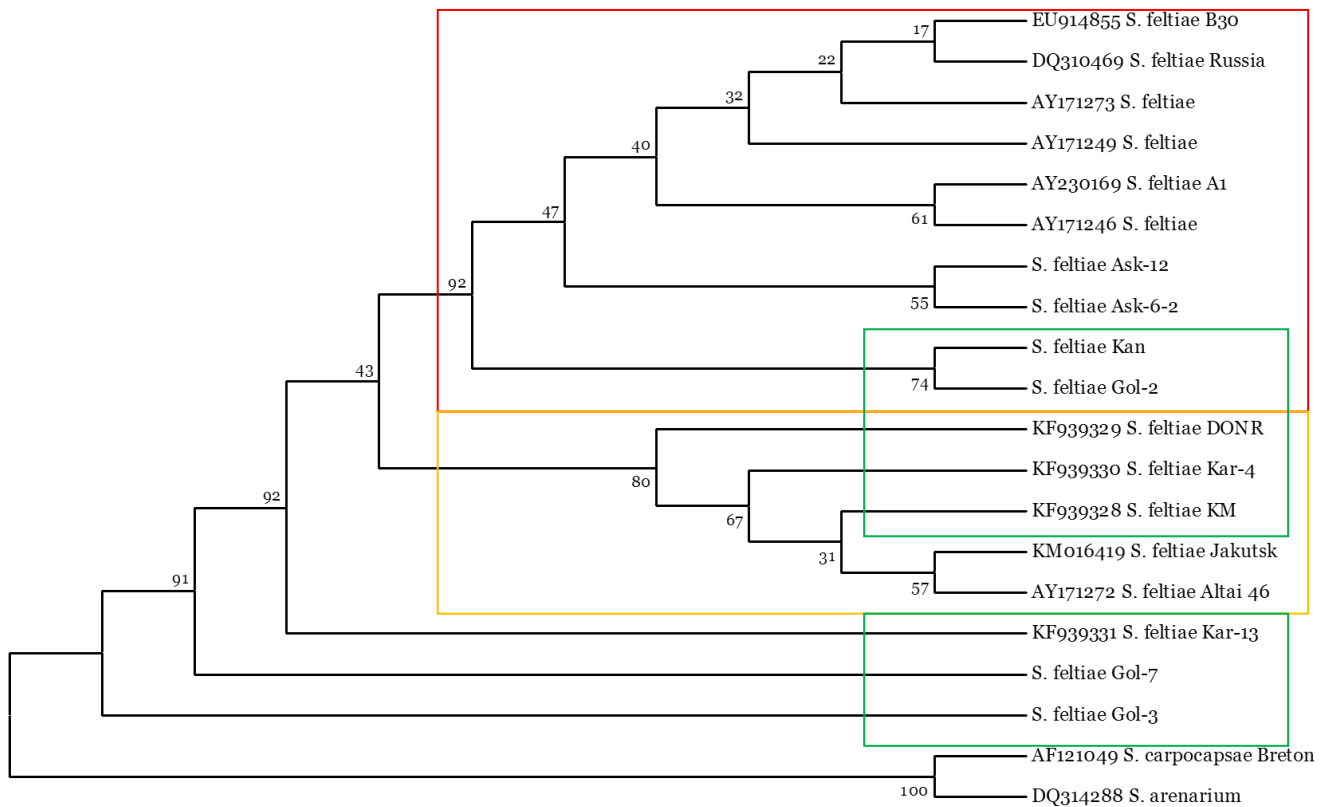


Рис. 3. Філогенетичні зв'язки всередині групи *S. feltiae* України. Дерево побудоване методом мінімуму еволюції, ME (в вузлах вказані р-дистанції; Close Neighbor-Interchange).

Через зараження культури сапробіонтними видами нематод, дорослих нематод не було отримано, наявні лише інвазійні личинки. Виходячи з аналізу морфологічних даних, можна припустити, що нематоди з даного ізоляту представлені видом *S. carpocapsae*.

МОРФОЛОГІЧНА МІНЛИВІСТЬ ІЗОЛЯТІВ *STEINERNEMA FELTIAE*

На основі отриманих морфометричних даних, було зроблено аналіз канонічних змінних з графічним відображенням для самців I та II генерації ізолятів виду *S. feltiae*, отриманих у даній роботі. Для аналізу було використано номінальні параметри L, W, EP, NR, ES, T, GL, SL. В аналізі для різних генерацій самців було використано частково відмінні ізоляти, оскільки отримання певних стадій розвитку нематод було ускладнене значним поширенням у колоніях нематод мікозів з порушенням репродукування ЕПН.

Було виявлено, що: самці I генерації (Рис. 4) вірогідно відрізняються за усіма номінальними морфометричними параметрами, крім "T" та "SL"; самці II генерації (Рис. 5) вірогідно відрізняються за усіма показниками крім "W", подібність збільшується для показників "ES" та "SL". Морфометричні параметри самців широко варіюють, що відображається на їх здатності об'єднуватися у групи: для самців I генерації ізоляти Kan та Gol-3 значущо відрізняються від групи «Ask-12-

Gol-2-Gol-7», ізолят Ask-6-2 займає перехідне положення; самці II генерації формують дві групи: «DONR-КМ-Kar-13» та «Gol-2-Gol-7-Kan».

Близькі територіально ізоляти потрапляють до різних груп. Ізолят Kan в I

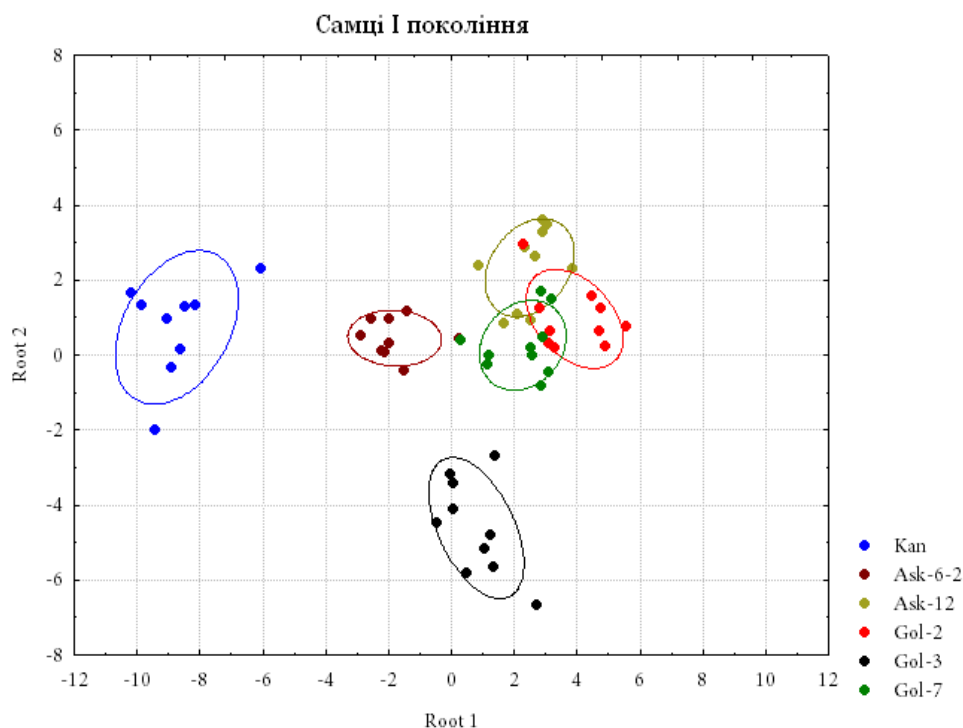


Рис. 4. Аналіз канонічних змінних для самців I генерації ізолятів виду *S. feltiae*. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95).

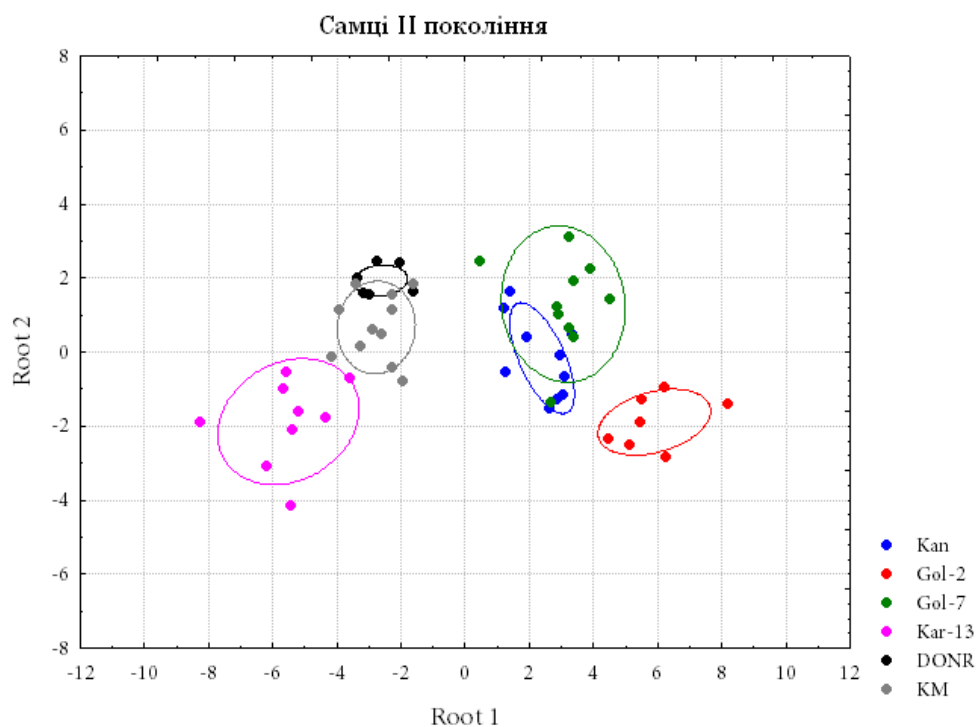


Рис. 5. Аналіз канонічних змінних для самців II генерації ізолятів виду *S. feltiae*. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95).

генерації знаходиться індивідуально, потім вливається до групи з Голосіївського НПП. Не виявлено закономірності у групуванні за територією виділення ізолятів, оскільки до даних груп потрапляють ізоляти, територіально розділені більше ніж на 600 км («Ask-12–Gol-2–Gol-7»).

МОРФОЛОГІЧНА МІНЛИВІСТЬ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ НЕМАТОД ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ПРИ РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Для виявлення зміни життєвих циклів ЕПН та їх морфології під впливом температурного фактору проведено експериментальне зараження личинок *Galleria mellonella* культурою ентомопатогенних нематод з ізоляту *S. arenarium* СН. Для експерименту були вибрані граничні температури культивування нематод у заражених комах: 28 °С та 18 °С. В якості контролю для порівняння морфології та різниці у темпах перебігу життєвого циклу було використано культуру ЕПН того ж ізоляту, культивованого при 22 °С. Отриманих нематод різних стадій розвитку підраховували. Виготовили постійні препарати для вимірювання морфометричних показників та вивчення деталей морфології. В контролі співвідношення кількості нематод різних стадій розвитку не підраховували. В якості морфометричних критеріїв для оцінки зміни показників використано: L, W, ES, T, ABD (♀), CBD (♂), V та коефіцієнти: V%, a, b, c.

Було виявлено закономірні зміни у морфології та життєвих циклах ентомопатогенних нематод, в залежності від температури культивування. Проведено аналіз дискримінантних функцій та канонічний аналіз з використанням промірів дорослих стадій розвитку ЕПН (Рис. 6-7). Виявилося, що на зміну температури

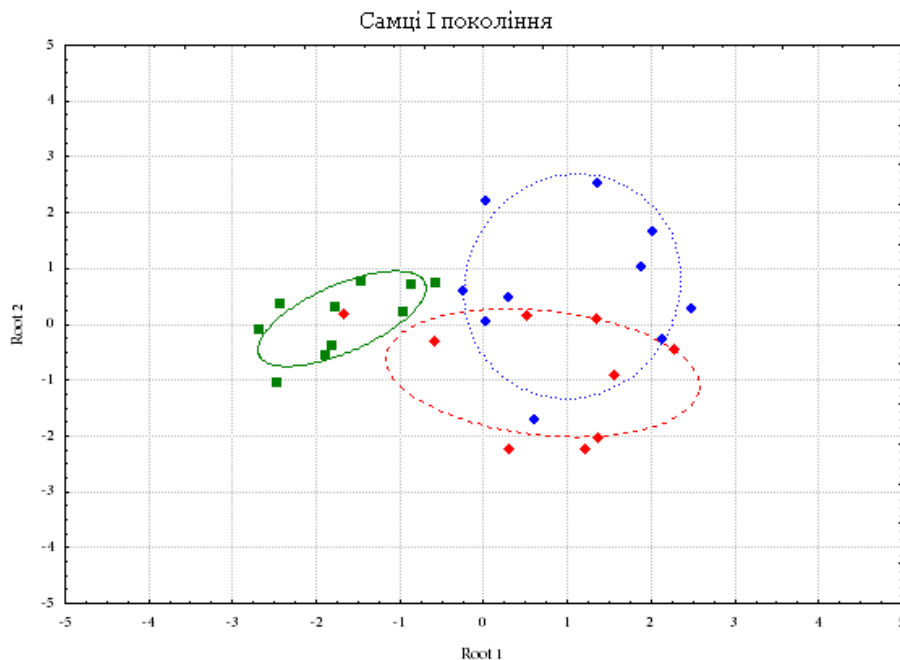


Рис. 6. Графіки аналізу канонічних змінних для самців I генерації. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95). Зеленим кольором позначено групу нематод, яку культивували при 22 °С, синім - 18 °С, червоним - 28 °С.

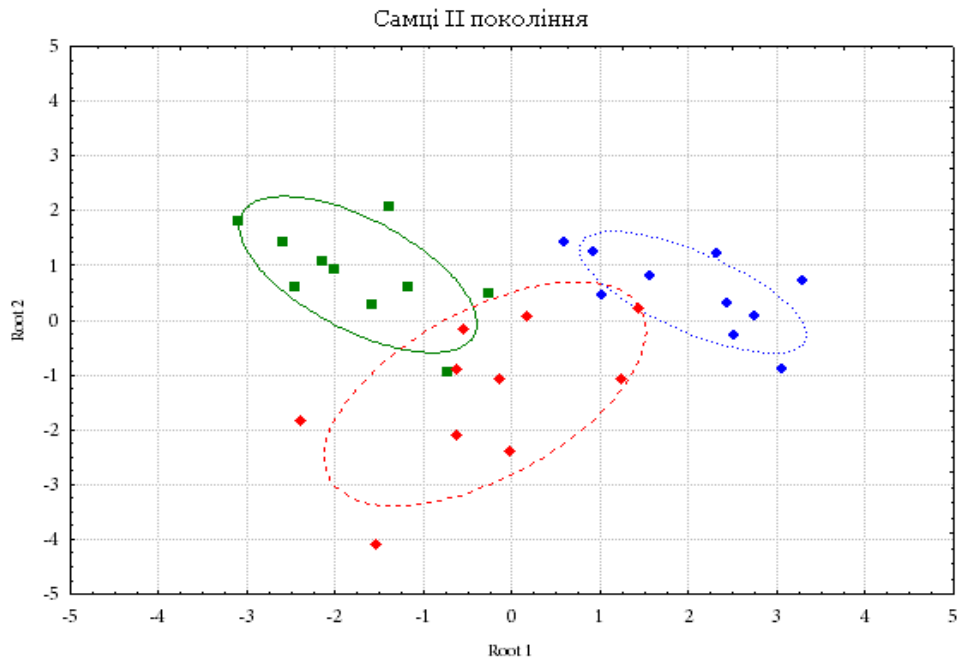


Рис. 7. Графіки аналізу канонічних змінних для самців II генерації. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95). Зеленим кольором позначено групу нематод, яку культивували при 22 °С, синім - 18 °С, червоним - 28 °С.

культивування, ентомопатогенні нематоди відповідають змінами усіх морфометричних параметрів. Самці I генерації, самиці I та II генерацій збільшуються у розмірах при культивуванні як при зменшенні температури, так і при її збільшенні. Самці II генерації збільшуються зі збільшенням температури культивування (від 18°C до 28°C). Як виявилось, найбільшою мінливістю у морфометричних параметрах відрізняються самиці ентомопатогенних нематод. У самиць ЕПН стабільним коефіцієнтом є V%, який лежить у межах 52-56 %. Самці I покоління мають вірогідне нерозходження ознак тільки за показником “Т”. Самці II покоління мають вірогідно низький рівень подібності за морфометричними параметрами, крім “Т”. Самиці I покоління мають вірогідно низьку подібність по параметру “W”. Самиці II генерації мають вірогідно знижену подібність по показникам “ES” та “Т”.

«ПІГМЕЙНІ» ОСОБИНИ

При дослідженні морфології виділених ізолятів ентомопатогенних нематод отримано так звані «пігмейні» дорослі особини (“pygmy” adults (Mráček, Sturhan та Reid, 2003; Yu *та ін.*, 2008)) самців та самиць різних генерацій. «Пігмейні» форми відрізняються скороченими розмірними характеристиками, аномаліями линьки, зовнішнього статевого апарату, проте вони здатні до розмноження.

Особини з аномаліями розвитку виявлено в природі лише в ізолятах *S. feltiae* Ask-6-2 та Ask-12. У ізоляту *S. arenarium* СН виявлено пігмейні особини в якості відповіді на дію стрес-фактору (температура). Розвиток за зміненої температури культивування співвідносився у них з утворенням «пігмейних» форм дорослих нематод: при 28 °С - 5,0 % серед самців I генерації, 18,2 % серед самиць I генерації, 15,8 % серед самиць II генерації; при 18 °С - 12,0 % серед самиць I генерації та лише

0,8 % серед самиць II генерації. «Пігмейні» форми були здатні до розмноження, у самиць I генерації спостерігалась *endotokia matricida*, самиці II генерації були здатні до відкладання яєць. При розвитку при температурі 28 °С характер морфологічних змін більш виражений, аніж при 18 °С. Більшість морфометричних параметрів «пігмейних» самиць I генерації, культивованих при 28 °С, не підлягає обліку внаслідок формування кутикулярних «шлейфів» та глибокого розташування основних структур.

Отримання пігмейних дорослих особин ЕПН у результаті експерименту можна пов'язати зі зміною характеру живлення та інтенсивності росту нематод. Так, при культивуванні при 18 °С мікропопуляція ЕПН зростає чисельно, дорослі особини споживають субстрат загалом більш інтенсивно, і личинки 4-го віку, які линяють пізніше, не встигають спожити достатньо субстрату для набору нормальної індивідуальної маси. При культивуванні при 28 °С при відносно невеликій чисельності мікропопуляції ЕПН значно зростає інтенсивність споживання субстрату нематодами і спостерігається подібний до пониженої температури ефект. Проте, зі збільшенням температури зростає й інтенсивність росту тканин нематод, але оскільки вона є нерівномірною для різних тканин, у дорослих пігмейних особин спостерігаються морфологічні аномалії.

Поява пігмейних особин у нативних культурах не пов'язана безпосередньо зі зміною умов культивування, оскільки культури ізоляту Ask отримано за кімнатної температури (20-22 °С), що незначно відрізняється від початкових умов збору ґрунтових проб. Можливе пояснення полягає у зміні комахи-хазяїна, оскільки природна спеціалізація даних ізолятів невідома і поява пігмейних особин може говорити про пристосування до живлення на новому субстраті (личинки *G. mellonella*).

ПОРІВНЯННЯ ЗАРАЖЕНОСТІ ЕНТОМОПАТОГЕННИМИ НЕМАТОДАМИ АГРОЦЕНОЗІВ ТА ПРИРОДНИХ ОСЕРЕДКІВ

На відміну від досліджених агроценозів, на об'єктах природно-заповідного фонду України представлені ентомопатогенні нематоди лише роду *Steinernema* з певними особливостями видового складу: вид *S. carpocapsae* не було знайдено, натомість, вид *S. arenarium* був представлений у двох пробах.

Судячи з отриманої інформації, *S. feltiae* є найпоширенішим видом на території України (4 % від сумарної кількості відібраних у агроценозах та біоценозах ґрунтових проб) (див. Табл. 1). Ймовірно, це пояснюється його значною стійкістю до факторів середовища та невибагливістю у виборі хазяїв.

Ентомопатогенні нематоди родів *Steinernema* та *Heterorhabditis* відрізняються представленістю у ґрунті: види роду *Steinernema* переважають над видами роду *Heterorhabditis* (Stock *et al.*, 1999, Edgington *et al.*, 2010). Зазвичай, види роду *Steinernema* знаходять більше у лісових масивах (найчастіше – у дубняках), *Heterorhabditis* – у садах та культивованих полях (Stock *et al.*, 1996, Stock *et al.*, 2008).

Таблиця 1.

Частка заселених ентомопатогенними нематодами проб від загальної кількості досліджених проб у агроценозах та природних екосистемах (N=1271)

Види	Агроценози	Природні екосистеми	Загалом	Домінантність
<i>Steinernema feltiae</i>	4.7%	2.3%	3.9%	42.2%
<i>Steinernema carpocapsae</i>	1.7%	?	1.1%	12.8%
<i>Steinernema arenarium</i>	—	0.5%	0.2%	1.8%
<i>Steinernema</i> sp., ізолят U2	—	0.2%	0.1%	0.9%
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	5.1%	—	3.2%	39.4%
Загалом	11.5%	3.0%	8.6%	100.0%

Примітка: таблиця побудована на основі оригінальних та літературних даних.

Різна представленість ЕПН у агроценозах та екосистемах з низьким антропогенним тиском є дискусивною: є приклади як активнішого заселення агроценозів (Mráček and Webster, 1993), так і більшого заселення природних екосистем (Amarasinghe *та ін.*, 1994). Різниця, скоріше за все, пов'язана з асоціацією нематод з комахами-хазяями, рН ґрунту (Khatri-Chhetri *та ін.*, 2010) та інтенсивністю використання отрутохімікатів (інсектицидів, нематоцидів).

ВИСНОВКИ

1. В результаті вперше проведеного комплексного дослідження фауни ентомопатогенних нематод в екосистемах природно-заповідного фонду України та Зони відчуження Чорнобильської АЕС кількість ґрунтових проб з ізолятами ентомопатогенних нематод склала приблизно 3 % від загалом 434 відібраних проб.

2. Виділені з екосистем природно-заповідного фонду України ізоляти ентомопатогенних нематод визначені морфологічними методами як види роду *Steinernema*. Методами молекулярно-генетичної ідентифікації окремі ізоляти ідентифіковані як види *Steinernema arenarium* (2 ізоляти), *Steinernema feltiae* (10 ізолятів). Морфологічними методами було визначено *Steinernema* sp. U2 (1 ізолят). Вид *Steinernema arenarium* зареєстрований в Україні вперше.

3. Ентомопатогенні нематоди обох видів виявляють значну індивідуальну морфологічну мінливість серед особин основних стадій життєвого циклу (перше та друге покоління дорослих, інвазійні личинки) за майже усіма номінальними параметрами та відповідними їм індексами, що не дає змоги коректно ідентифікувати окремі види лише за особливостями морфології та морфометричними параметрами.

4. Значна морфологічна мінливість самців та самиць обох поколінь ентомопатогенних нематод залежить від якості та кількості поживного субстрату в трупі комах, швидкості росту та набору індивідуальної маси дорослих особин нематод. Залежно від температури, змінюється тривалість життєвого циклу, статеве та кількісне співвідношення поколінь нематод, кількість інвазійних личинок, що вийшли.

5. В двох нативних культурах ізолятів ентомопатогенних нематод *S. feltiae* та експериментальній культурі *S. arenarium* ізоляту СН було виявлено «пігмейних» дорослих особин. Для виду *S. arenarium* «пігмейні» особини зареєстровані вперше. Встановлено, що ці нематоди зберігають здатність до розмноження. При культивуванні за високої температури виявлено ряд морфологічних аномалій, поява яких свідчить про нерівномірність росту внутрішніх структур нематод в умовах нестачі живлення.

6. Порівняно з агроценозами України, ентомопатогенні нематоди природно-заповідного фонду зустрічаються приблизно в 4 рази менше та представлені лише видами роду *Steinernema*. Згідно з нашими дослідженнями, *S. feltiae* є найпоширенішим видом ентомопатогенних нематод на території України (42 % від сумарної кількості позитивних проб з агроценозів та природно-заповідного фонду).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

Статті у наукових фахових виданнях

1. Yakovlev, Ye., Nermut, J., Půža, V., Kharchenko, V., Mráček, Z. 2017. New record of *Steinernema arenarium* (Artyukhovsky) (Rhabditida: Steinernematidae) from Ukraine and a note on its distribution. *Acta Parasitologica*, 62, 2, 255-264.
2. Yakovlev, Ye. B., Kharchenko, V. A. 2016. Over World Distribution of Steinernematidae та Heterorhabditidae (Nematoda, Panagrolaimida et Rhabditida) Entomopathogenic Nematodes. *Studia Biologica*, 10, 175-182.
3. Yakovlev, Ye. B., Kharchenko, V. A. 2015. The effect of temperature on the development of adult generations of entomopathogenic nematode *Steinernema arenarium* isolate СН. *Vestnik zoologii*, 49, 325-332.
4. Яковлев, Є. Б., Харченко, В. О. 2015. Методи вивчення ентомопатогенних нематод. *Вісник Київського Національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*, 68, 51-54.
5. Yakovlev, Ye. B., Kharchenko, V. A., Mráček, Z. 2014. Findings of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida, Steinernematidae) in Nature Reserves in Ukraine. *Vestnik zoologii*, 48, 167-173.

Тези доповідей і матеріали конференцій

1. Яковлев, Є. Б. 2014. Знахідка ентомопатогенних нематод на території Української Зони відчуження ЧАЕС. Харківські зоологічні читання пам'яті професора Юхима Лукіна, 6-10 жовтня 2014, Харків. 49.
2. Яковлев, Є. Б., Харченко, В. О. 2013. Ентомопатогенні нематоди природних екосистем України. У: Акімов, І. А., ред. XV Конференція Українського наукового товариства паразитологів, 15-18 Жовтня, 2013, Чернівці. УНТП, 111.
3. Яковлев, Є. Б. 2012. Знахідки ентомопатогенних нематод родини Steinernematidae в Україні. Конференція молодих дослідників-зоологів, 18-19 квітня, 2012, Київ. 36-37.
4. Харченко, В. О., Кубайчук, О. О., Яковлев, Є. Б. 2009. Класифікація личинок ентомопатогенних нематод. XIV Міжнародна науково-практична конференція «Інформаційні технології в економіці, менеджменті і бізнесі. Проблеми науки, практики і освіти», 27 листопада, 2009 рік, Київ. 309.

5. Сігарьова, Д. Д., Олененко, В. В., Граціанова, Н. В., Яковлєв, Є. Б. 2009. Поширення Ентомопатогенних Нематод Родин *Steinernematidae* та *Heterorhabditidae* в Біоценозах України. У: Акімов, І. А., ред. XIV Конференція Українського наукового товариства паразитологів: Тези доповідей, 21-24 вересня 2009 р., Ужгород. 103.

6. Яковлєв, Є. Б., Олененко, В. В. 2009. До фауни ентомопатогенних нематод родин *Steinernematidae* та *Heterorhabditidae* (Nematoda: Rhabditida) Центрального лісостепу України. Зоологічна наука у сучасному суспільстві: Матеріали Всеукраїнської наукової конференції, присвячені 175-річчю заснування кафедри зоології, 2009, Київ. Фітосоціоцентр, 516-520.

7. Яковлєв, Є. Б. 2009. Щодо видового складу ентомопатогенних нематод родин *Steinernematidae* та *Heterorhabditidae* (Nematoda: Rhabditida) в зоні центрального лісостепу України. Конференція молодих дослідників-зоологів, 08-09 квітня, 2009, Київ. 61.

АНОТАЦІЯ

Яковлєв Є. Б. Ентомопатогенні нематоди (Nematoda: Rhabditida) в природних екосистемах України. – На правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю «03.00.25 – Паразитологія, гельмінтологія». – Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України. – Київ, 2017.

В дисертаційній роботі висвітлено результати першого дослідження фауни ентомопатогенних нематод у природних екосистемах, що входять до складу природно-заповідного фонду України. В складі нативної фауни ентомопатогенних нематод виявлено лише нематод з родини *Steinernematidae*, роду *Steinernema* Travassos, 1927, а саме: *S. arenarium* (Artyukhovsky, 1967) (2 ізоляти), *S. feltiae* Filipjev, 1934 (10 ізолятів), *Steinernema* sp. ізолят U2. Ідентифікацію видової належності ентомопатогенних нематод проводили за допомогою сукупності морфологічних, морфометричних та молекулярно-генетичних методів. Проведено філогенетичний аналіз за нуклеотидними послідовностями НТД I–5,8 S–НТД II та D2-D3 рДНК для виду *S. arenarium* та НТД I–5,8 S–НТД II для виду *S. feltiae*. Для сукупності ізолятів виду *S. arenarium* виявлено залежність у поширенні з географічними характеристиками району досліджень. Внаслідок виявленого значного поліморфізму нуклеотидного складу дослідженого відрізка рДНК біогеографічне тлумачення поширення ізолятів виду *S. feltiae* поки що неможливе. Виявлено, що ентомопатогенні нематоди проявляють значну мінливість майже за усіма номінальними морфометричними параметрами. В роботі також проаналізований вплив абіотичних факторів на розвиток нематод та продуктивність розмноження виду *S. arenarium* ізоляту СН в умовах наближених до природних. Виявлено, що зміна температурного режиму культивування значущо впливає на морфометричні ознаки дорослих ентомопатогенних нематод, чисельність інвазійних личинок при евазії з трупа комахи та призводить до розвитку морфологічних аномалій дорослих нематод (формування «пігмейних» дорослих особин), що опосередковано вказує на зміни у характері живлення нематод в умовах замкненого простору та вичерпної кількості поживних речовин. Вперше було зареєстровано

«пігмейних» особин для виду *S. arenarium* ex situ та було виявлено in situ для ізолятів виду *S. feltiae*.

Ключові слова: *ентомопатогенні нематоди, Україна, природно-заповідний фонд*

АННОТАЦІЯ

Яковлев Е. Б. Энтومопатогенные нематоды (Nematoda: Rhabditida) в природных экосистемах Украины. – На правах рукописи. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.00.25 – Паразитология, гельминтология». – Институт зоологии имени И. И. Шмальгаузена НАН Украины. – Киев, 2017.

В диссертационной работе рассматриваются результаты первого исследования фауны энтومопатогенных нематод в природных экосистемах, которые входят в состав природно-заповедного фонда Украины. В составе нативной фауны энтومопатогенных нематод обнаружены только нематоды из семейства Steinernematidae, рода *Steinernema* Travassos, 1927, а именно: *S. arenarium* (Artyukhovsky, 1967) (2 изолята), *S. feltiae* Filipjev, 1934 (10 изолятов), *Steinernema* sp. изолят U2. Идентификацию видовой принадлежности энтومопатогенных нематод проводили с помощью совокупности морфологических, морфометрических и молекулярно-генетических методов. Проведён филогенетический анализ по нуклеотидным последовательностям НТУ I–5,8 S–НТУ II и D2-D3 рДНК для вида *S. arenarium* и НТУ I–5,8 S–НТУ II для вида *S. feltiae*. Для совокупности изолятов вида *S. arenarium* обнаружена зависимость распространения от географических характеристик района исследований. Вследствие обнаруженного значительного полиморфизма нуклеотидного состава исследованного отрезка рДНК биогеографическое толкование распространения изолятов вида *S. feltiae* пока что не возможно. Обнаружено, что энтومопатогенные нематоды проявляют значительную изменчивость почти по всем номинальным морфометрическим параметрам. В работе также проанализировано влияние абиотических факторов на развитие нематод и продуктивность размножения вида *S. arenarium* изолята СН в условиях, приближенных к природным. Обнаружено, что изменение температурного режима культивирования значимо влияет на морфометрические признаки взрослых энтومопатогенных нематод, численность инвазионных личинок при эвазии из трупа насекомого и приводит к развитию морфологических аномалий у взрослых нематод (формирование «пігмейних» взрослых особей), что опосредованно указывает на изменения в характере питания нематод в условиях замкнутого пространства и исчерпаемого количества питательных веществ. Впервые были зарегистрированы «пігмейные» особи для вида *S. arenarium* ex situ и были выявлены in situ для изолятов вида *S. feltiae*.

Ключевые слова: *энтومопатогенные нематоды, Украина, природно-заповедный фонд.*

SUMMARY

Yakovlev Ye. B. Entomopathogenic Nematodes (Nematoda: Rhabditida) in the Natural Ecosystems of Ukraine. – Manuscript. Dissertation for the scientific degree of candidate of biological sciences, specialty “03.00.25 – Parasitology, helminthology”. – Schmalhausen Institute of Zoology NAS of Ukraine. – Kyiv, 2017.

In the dissertation work, the results of the first study of the entomopathogenic nematodes in natural ecosystems that are part of the nature reserve fund of Ukraine are presented. In general, 434 soil samples were analyzed from 23 nature reserve fund objects. In the composition of native fauna of entomopathogenic nematodes, only nematodes of the family Steinernematidae, genus *Steinernema* Travassos, 1927, are present, namely: *S. arenarium* (Artyukhovsky, 1967) (2 isolates), *S. feltiae* Filipjev, 1934 (10 isolates), *Steinernema* sp. isolate U2. *S. arenarium* is registered in Ukraine for the first time. Identification of entomopathogenic nematodes was conducted using combination of morphological, morphometric and molecular genetic methods. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of ITS I-5.8 S-ITS II and D2-D3 of the rDNA of *S. arenarium*, and ITS I-5.8 S-ITS II of *S. feltiae* was conducted. Dependence of distribution with geographical characteristics of research area was revealed for a set of isolates of the species *S. arenarium*. As a result of determined significant polymorphism of the nucleotide composition of the investigated segment of rDNA, the biogeographical interpretation of isolates' distribution of *S. feltiae* is not yet possible. It was revealed that entomopathogenic nematodes exhibit significant variability in almost all nominal morphometric parameters that makes it impossible to correctly identify individual species only by features of morphology and morphometric parameters. The influence of abiotic factors on development and reproduction productivity of the species *S. arenarium* isolate CH in the conditions close to the natural ones were also analyzed. It was determined that changes in cultivation temperature regime significantly affected the morphometric characteristics of adult entomopathogenic nematodes, the number of invasive larvae in the evacuation from the insect corpse and led to the development of morphological anomalies of adult nematodes (the formation of "pygmy" adult individuals). This indirectly indicates changes in the nature of nematodes' nutrition under conditions of closed space and exhaustive quantity of nutrients. "Pygmy" individuals of *S. arenarium* ex situ were registered for the first time, and were found in situ in *S. feltiae* isolates. When providing cultivation of the *S. arenarium* at high temperature, a number of morphological anomalies were revealed. Appearance of these anomalies indicates growth unevenness of nematodes internal structures in the conditions of nutrition lack. It was also found out that entomopathogenic nematodes of the nature reserve fund are present in approximately four times less than in agrocenoses, and are represented only by species of the genus *Steinernema*. On the basis of original and literature data analysis it was found out that *S. feltiae* and *H. bacteriophora* are the most common in the territory of Ukraine (42% and 39% respectively, from the total number of positive samples taken from agrocenoses and territories of nature reserve fund of Ukraine).

Keywords: *entomopathogenic nematodes, Ukraine, nature reserve fund.*