

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЯКОВЛЄВ ЄГОР БОРИСОВИЧ

УДК 591.619(595.7):(1-751.3)(477)

ДИСЕРТАЦІЯ

ЕНТОМОПАТОГЕННІ НЕМАТОДИ (NEMATODA: RHABDITIDA)

В ПРИРОДНИХ ЕКОСИСТЕМАХ УКРАЇНИ

03.00.25 – Паразитологія, гельмінтологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Яковлєв Є. Б.

Науковий керівник В. О. Харченко, к.б.н.

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Яковлев Є. Б. Ентомопатогенні нематоди (Nematoda: Rhabditida) в природних екосистемах України. – Кваліфікаційна наукова праця 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.

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 та 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 CH. *Vestnik zoologii*, 49, 325-332.
4. Яковлєв, 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. Яковлєв, 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. Яковлєв, 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. Яковлєв, 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., Яковлєв, 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ВЖИВАНИХ ТЕРМІНІВ.....	7
ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	14
1.1. Стан досліджень ентомопатогенних нематод	14
1.1.1. Історія вивчення ентомопатогенних нематод	14
1.1.2. Характеристика окремих генів та філогенія ентомопатогенних нематод	17
1.2. Особливості морфології ентомопатогенних нематод	19
1.2.1. Родина Steinernematidae.....	20
1.2.2. Родина Heterorhabditidae	22
1.3. Життєві цикли ентомопатогенних нематод.....	23
1.4. Перспективи дослідження ентомопатогенних нематод	26
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕНЬ	27
2.1. Територія проведення досліджень	27
2.2. Фізико-географічна характеристика району досліджень.....	29
2.2.1. Зона мішаних лісів	29
2.2.2. Лісостепова зона	30
2.2.3. Степова зона	31
2.2.4. Українські Карпати	32
2.2.5. Кримські гори	34
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ.....	36
3.1. Відбір проб.....	36
3.2. Виявлення інвазійних личинок ентомопатогенних нематод в лабораторних умовах	36
3.3. Культивування тест-комах	37
3.4. Культивування ентомопатогенних нематод.....	38
3.5. Виявлення ентомопатогенних нематод за ознаками зараження тест-комах	38
3.6. Фіксація матеріалу та виготовлення препаратів	39

3.7.	Дослідження морфології та морфометрія.....	40
3.8.	Статистична обробка даних	43
3.9.	Молекулярно-генетичні дослідження	43
3.9.1.	Підготовка до полімеразно-ланцюгової реакції. Екстракція ДНК .	43
3.9.2.	Полімеразно-ланцюгова реакція. Ділянка геному НТД 1–5.8S– НТД 2 (ITS1-5.8S-ITS2)	44
3.9.3.	Електрофорез у гелі	45
3.9.4.	Обробка результатів сіквенсування. BLAST	48
	РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ	49
4.1.	Виявлені ізоляти.....	49
4.2.	Ізоляти ентомопатогенних нематод, виділені у об'єктах природно- заповідного фонду України.....	50
4.2.1.	Ізоляти <i>Steinernema arenarium</i> (Artyukhovsky, 1967) Wouts <i>ma in.</i> , 1982	50
4.2.2.	Ізоляти <i>Steinernema feltiae</i> (Filipjev, 1934) Wouts <i>ma in.</i> , 1982	58
4.2.3.	Морфологічна мінливість ізолятів <i>Steinernema feltiae</i>	72
4.2.4.	Ізолят <i>Steinernema</i> sp. U2.....	76
4.3.	Поширення ентомопатогенних нематод	77
4.3.1.	Розподіл ентомопатогенних нематод світу за біогеографічними областями	77
4.3.2.	Ентомопатогенні нематоди України та прилеглих територій.....	84
4.3.3.	Залежність поширення ентомопатогенних нематод від біотичних та абіотичних факторів	88
4.4.	Вплив температурного фактору на мінливість ентомопатогенних нематод	93
4.5.	«Пігмейні» особини	105
	ВИСНОВКИ	111
	СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	113
	ДОДАТКИ	128

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ВЖИВАНИХ ТЕРМІНІВ

Загальні скорочення:

AF – амфіміктична самиця (amphimictic female);

Dauer-личинка – личинка III (L3, L2d) стадії розвитку рабдитид, призначена для розселення;

IЛ – інвазійна личинка, те ж саме, що і Dauer-личинка;

M 1, 2 – самець (male);

F 1, 2 – самиця (female);

HF – гермафродитна самиця (hermaphroditic female);

SD – середнє квадратичне відхилення (standard deviation);

ПЗ – Природний заповідник;

БЗ – Біосферний заповідник;

ЕПН – ентомопатогенні нематоди;

ЖЦ – життєвий цикл;

мкл – мікролітр;

мкм – мікромметр;

ОД/мкл – форма вираження концентрації білку у розчині, одиниць на мікролітр;

Енергетичний пул (в контексті роботи) – резервний структурний елемент енергетичних ресурсів організму; адаптаційний механізм для підтримування гомеостазу ІЛ на стадії пошуку комахи-хазяїна.

Ізолят – виділена на основі географічного положення суб-популяція ентомопатогенних нематод.

Молекулярно-генетичні дослідження:

(18, 40, 28, 45) S – субодиниця (Subunit);

COI – позначення гену, що кодує I субодиницю цитохромоксидази;

COII - позначення гену, що кодує II субодиницю цитохромоксидази;

ВТГ – великий транскрибуючий ген;

зДЛ – загальна довжина ланцюга;
НТД (ITS) – не транскрибуюча ділянка (internal transcribed spacer);
ПЛР – полімеразно-ланцюгова реакція;
по – пара основ;
псДНК – ДНК подвійно спіралізована;
рДНК – рибосомна дезоксирибонуклеїнова кислота;
рРНК – рибосомна рибонуклеїнова кислота;
рРНК ВСО (GSU) – рРНК великої субодиниці;
рРНК МСО (SSU) – рРНК малої субодиниці;
сдв – середня довжина відрізка.

Морфологічні позначення на рисунках:

an – (anus) анус;
blbs – (bulbus basalis) базальний бульбус;
car – (cardia) кардія;
cpcut – (capsula cuticulara) кутикулярний чохлик;
de – (ductus ejaculatorius) сім'явивідний канал;
exp – екскреторна пора;
gb – (gubernaculum) рульок;
glcdl – (gltaula caudalis) хвостова залоза;
int – (intestinum) кишечник;
ist – (isthmus) істмус;
nrv – нервово кільце;
pplgn – (papilla genitaliae) статеві папіли;
sp – (spiculi) спікули.

ВСТУП

Ентомопатогенні нематоди родин *Steinernematidae* Chitwood, Chitwood 1937 та *Heterorhabditidae* Poinar 1975 відносяться до перспективних для біологічного методу патогенів комах. Родина *Steinernematidae* вміщує два роди: *Steinernema* (Travassos, 1927) (близько 90 видів) та *Neosteinernema* (Nguyen, Smart, 1994) (1 вид). Родина *Heterorhabditidae* складається з двох родів: *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) (близько 20 видів) та *Heterorhabditoides* Zhang, 2008 (1 вид). Вони мутуалістично пов'язані з бактеріями родів *Photorhabdus* Boemare, Akhurst et Mourant, 1979 (характерні для нематод роду *Heterorhabditis*) та *Xenorhabdus* Thomas et Poinar, 1965 (характерні для нематод роду *Steinernema*), завдяки яким перетравлюють внутрішні органи комах. Протягом XX ст. ентомопатогенні нематоди неодноразово привертали увагу науковців зі всього світу. Сьогодні ми спостерігаємо експоненціальний ріст таксономічних та екологічних досліджень цієї групи. Причинами цього є рентабельність та мінімізована шкода для екосистем при їх застосуванні як агента біометоду. Це зумовлено тим, що:

1. ентомопатогенні нематоди зручні у практичному застосуванні в агроценозах та закритому ґрунті;
2. ентомопатогенні нематоди швидко розмножуються на штучних поживних середовищах;
3. різні види ентомопатогенних нематод після селекції можна цілеспрямовано використовувати проти певних видів шкідників, забезпечуючи високий патогенний вплив на них;
4. на відміну від хімічних агентів, немає потреби вносити в агроценоз препарати на основі ентомопатогенних нематод регулярно;
5. експериментальним шляхом встановлено, що ентомопатогенні нематоди абсолютно безпечні для теплокровних хребетних тварин і мало патогенні (не летальні) для амфібій.

До сьогодні найкраще вивчені ентомопатогенні нематоди агроценозів, що зумовлено практичними інтересами розробників біологічних методів боротьби

зі шкідниками сільськогосподарських культур. Ентомопатогенні нематоди природних екосистем, зокрема охоронних та заповідних територій, досі в Україні не вивчалися, що й зумовило спрямування наших досліджень.

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 комахи-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 задачі 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 *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. Отримані дані про географічну структуру природних мікропопуляцій ентомопатогенних нематод України.

Вперше проведено молекулярно-генетичне дослідження виділених з території України ізолятів видів ентомопатогенних нематод з роду *Steinernema*. Ідентифіковано види *Steinernema arenarium* (2 ізоляти) та *S. feltiae* (10 ізолятів).

Вид *S. arenarium* був 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. Нермутем (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 передують 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Стан досліджень ентомопатогенних нематод

1.1.1. Історія вивчення ентомопатогенних нематод

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 амфібій та рептилій, у рід *Steinernema* Travassos, 1927 (Travassos, 1927). Інший вид – *Neoaplectana glaseri* Steiner, 1929 (Steiner, 1929) був виділений з мертвої личинки японського жука *Popillia japonica* Newman, 1838 у Нью-Джерсі. Для цього виду Г. Штайнер створив окремий рід *Neoaplectana* Steiner, 1929, оскільки дані нематоди, на відміну від нематод з роду *Steinernema*, мали два ряди губних папіл. Обидва роди були віднесені до родини Oxyuridae.

У 1934 році І. М. Філіп'єв описав *Neoaplectana feltiae* Filipjev, 1934 (Filipjev, 1934) з личинок озимої совки *Feltia segetum* Schiff, 1775 та об'єднав два роди в підродину Steinernematinae в складі родини Anguillidae, на основі наявності dauer-личинки (dauer-larva) та морфологічної різниці з представниками підряду Oxyurata (нині ряду Oxiurida) (будова статевих органів самців, відмінності у структурі стравоходу). В 1937 році П. Бові (Bovien, 1937) в Данії відкрив два нові види неоаплектан – *Neoaplectana bibionis* Bovien, 1937 та *N. affinis* Bovien, 1937 з двокрилих – *Bibio ferruginatus* L., 1767, *B. hortulanus* L., 1758 та *Dilophus vulgaris* Meigen, 1818. Дані види П. Бові диференціював на основі морфометричних ознак самців та личинок третьої стадії і відмінностей в життєвих циклах. П. Бові виявив, що личинки третьої стадії розвитку *N. affinis* залишаються неактивними поки залишається живою заражена комаха. При експериментальному зараженні двох личинок жука

Telephorus sp. було виявлено, що після їх загибелі в порожнині тіла кожної комахи знаходились як дорослі так і ювенільні нематоди. Ці дослідження показали, що активність личинки *N. affinis* всередині комахи, залежить від виду хазяїна і сили його імунітету (Lackie, 1988). Того ж року, Бенджамін та Мей Чітвуд підняли ранг Steinernematinae до родини (Chitwood та Chitwood, 1937).

1955 року Й. Вайзер 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.

На території Радянського Союзу протягом 1950-70 рр. велися роботи з дослідження нематод, що паразитують у 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).

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 від довгоносика (*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).

Сьогодні ЕПН відносять до класу Chromadorea; надряду Rhabditica; ряду Panagrolaimida; підряду Panagrolaimina; надродини Steinernematoidea (родина Steinernematidae), та ряду Rhabditida; підряду Rhabditina; надродини Heterorhabditoidea (родина Heterorhabditidae) (Hodda, 2011). Однак тут ми притримуємось традиційної класифікації.

Глейзером (у 1942) та Бові (у 1937) було встановлено, що нематоди роду *Steinernema* Travassos, 1927 знаходяться у мутуалістичній взаємодії з невідомими на той час бактеріями (Wouts, 1991). Пізніше, дані симбіонти були описані як *Pseudomonas septica* (Ritter та Theodorides, 1966), *P. aeruginosa* (Weiser, 1962) та *Achromobacter nematophilus* (Poinar та Thomas, 1965), та у 1979 році включені до складу роду *Xenorhabdus* Thomas et Poinar, 1979. Для ЕПН роду *Heterorhabditis* Poinar, 1976 встановлено, що вони взаємодіють з бактеріями роду *Photorhabdus* Boemare, Akhurst et Mourant, 1979 (Ciche *та ін.*, 2006) для перетравлення їжі.

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; Сігарьова *та ін.*, 2009; Яковлєв та Олененко, 2009; Sigareva, Olenenko та Gratsianova, 2008).

1.1.2. Характеристика окремих генів та філогенія ентомопатогенних нематод

Кількість хромосом є консервативною ознакою для видів родів *Steinernema* (n=5) та *Heterorhabditis* (n=7), за винятком ряду ізолятів *Steinernema* sp. NC 513 з трьома хромосомами. Варіацій всередині видів чи ізолятів не спостерігали (Curran, 1989).

На сьогодні, для вивчення філогенетичного положення нематод, широко використовуються методи молекулярно-генетичного аналізу ділянки геномної ДНК, що є відповідальним за продукцію 45S попередника рРНК. Даний відрізок поділяється на ряд генів, відповідальних за транскрипцію різних типів рРНК:

рДНК малої субодиниці рибосоми (18S-відрізок). рРНК-транскрипт даного гену, після модифікації, входить до складу малої субодиниці рибосоми еукаріот (40S). Даний ген є придатним для вивчення систематики нематод на рівні родин та родів, оскільки він є еволюційно стійким, тобто дуже повільно змінюється в часі. Він використовується для філогенетичного аналізу нематод починаючи з рівня докембрію (Nasmith *та ін.*, 1996).

рДНК великої субодиниці рибосоми (28S-відрізок). рРНК-транскрипт даного гену, разом із транскриптом 5.8S-відрізка, після модифікації і нарізки попередника, входять до складу 60S-субодиниці рибосоми (великої субодиниці). Згідно певних досліджень (Nasmith *та ін.*, 1996) аналіз складу послідовностей даного гену від нематод є придатним для філогенетичного аналізу починаючи від рівня палеозойської та мезозойської геологічної ери.

Завдяки аналізу даних генів (MCO та BCO) можна чітко прослідкувати близькість *Steinernematidae* до родин *Strongyloididae* та *Panagrolaimidae*, а *Heterorhabditidae* – до *Strongylidae* (Blaxter *та ін.*, 1998) (Рис. 1.1).

Внутрішній транскрибуючий ген (ВТГ, ITS). До його складу входять внутрішні транскрибуючі відрізки 1 та 2, 5.8S-відрізок (Рис. 1.2). Він значно мінливіший за МСО та ВСО, і, внаслідок цього придатний для таксономічної ідентифікації на рівнях виду та внутрішньовидових груп (Szalanski, Taylor та Mullin, 2000). Так, відмінності у нуклеотидному складі частини даного гену, що була виділена за допомогою рестриктази DdeI у географічно віддалених ізолятів ЕПН є таким: у *S. affine* – вони склали 2-5 по, або 0,2-0,6 % здл, *S. kraussei* до 1 % (1-11 по), *S. feltiae* – від 0,1 до 2,4 %, *S. bicornutum* – 2,2 %

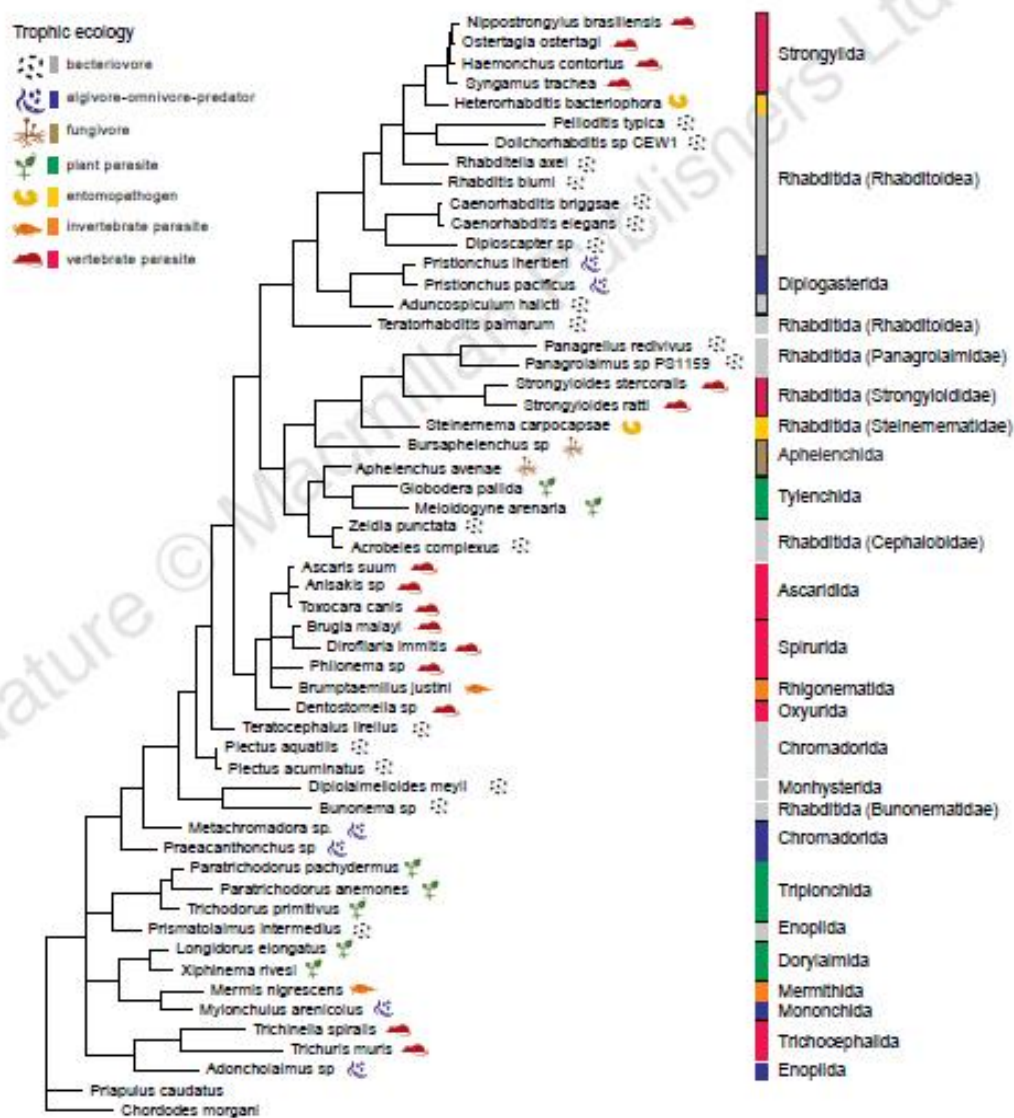


Рис. 1.1. Узагальнена дендрограма (з 33 малих дерев) отримана методом максимальної економії із сіквенсів нематод з 53 таксонів. Праворуч кольорами відмічена трофічна спеціалізація нематод, розшифрування подано англійською зліва зверху. Подано за Блакстером *та ін.* (Blaxter *та ін.*, 1998).

(ізоляти з Югославії та Росії) = 17 по, відмінності між ізолятами *S. carpocapsae* з США та Росії склали лише 0,4 % (3 по), загалом, відмінності по даному відрізку між видами роду складає від 2-12 % (Spiridonov та Grunder, 2003; Szalanski, Taylor та Mullin, 2000).



Рис. 1.2. Загальний план будови групи генів 18S-28S (Оригінал).

На основі дослідження нуклеотидного складу даного відрізку геномної ДНК (Spiridonov *та ін.*, 2004), та аналізу відмінностей його складу у ізолятів з різних вибірок, деякими авторами групи *Steinernematidae* було поділено на 5 клад ():

1. група “*affine-intermedium*” – середня довжина відрізку складає 825 по, до цієї групи відносяться види *S. affine*, *S. intermedium*, *S. rarum*, *S. neocurtillae*;
2. група “*carpocapsae-scapteriski-tami*” – сдв = 775 по, до цієї групи входять: *S. scapteriski*, *S. tami*, *S. carpocapsae*, *S. rarum*, *S. monticolum*;
3. група “*feltiae-kraussei-oregonense*” – сдв = 825 по. *S. feltiae*, *S. weiseri*, *S. kraussei*, *S. oregonense*, *S. monticolum* ;
4. група “*bicornutum-ceratophorum-riobrave*” – сдв = 840 по. *S. bicornutum*, *S. ceratophorum*, *S. abbasi*, *S. pakistanense*, *S. riobrave*, *S. intermedium*, *S. rarum*;
5. група “*arenarium-glaseri-karii-longicaudum*” – сдв = 836 по. *S. cubanum*, *S. glaseri*, *S. arenarium*, *S. longicaudum*, *S. diaprepesi*, *S. karii*, *S. rarum*, *S. neocurtillae*.

1.2. Особливості морфології ентомопатогенних нематод

Дане питання викладено за (Gaugler, 2002) та (Nguyen та Hunt, 2007), де воно детально розглянуте.

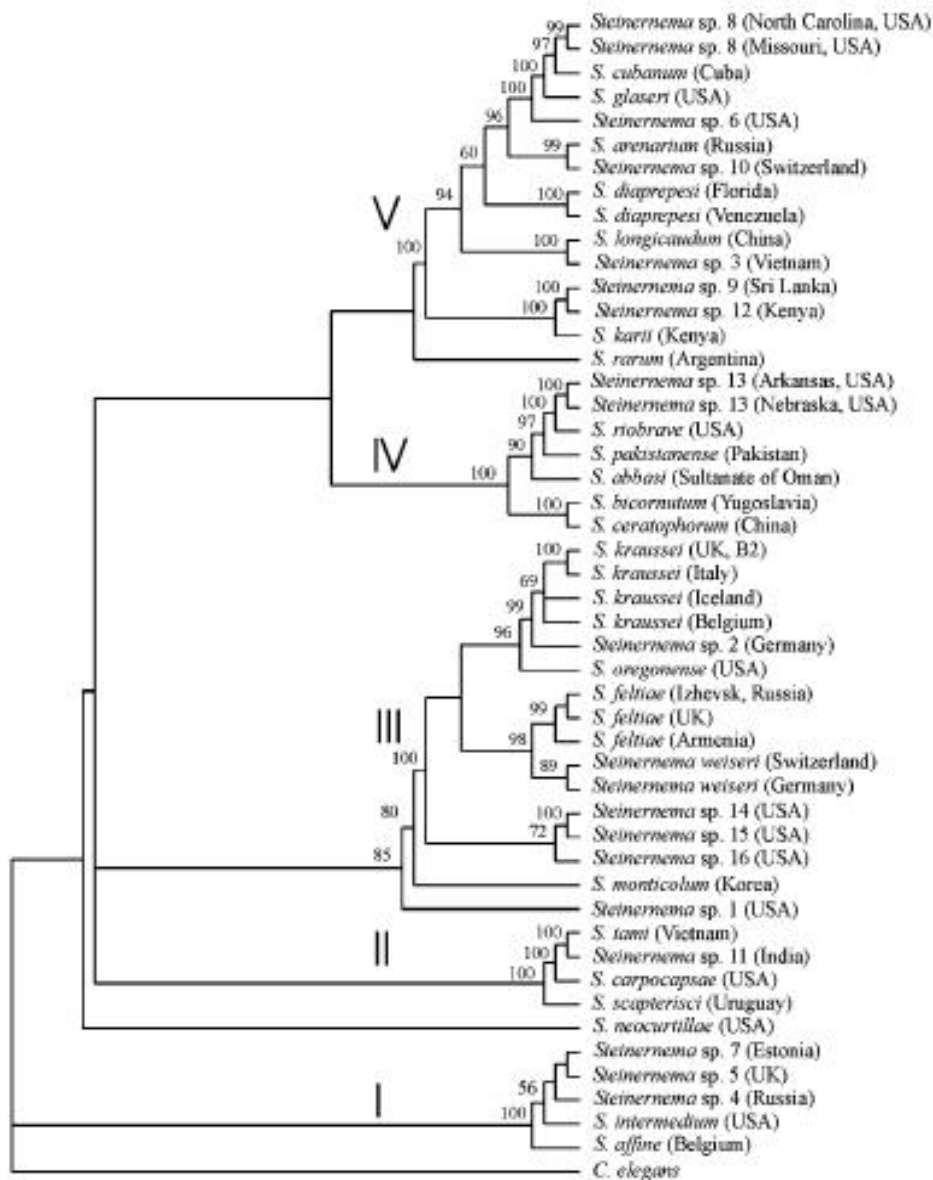


Рис. 1.3. Узагальнена (консенсусна) кладограма чотирьох дерев (метод максимальної економії), отримані після аналізу послідовностей видів роду *Steinerneema*. Використані базові опції ClustalW. Бутстреп більше 50 % наведено в вузлах. Подано за Спірідоновим та Грюндером (Spiridonov та Grunder, 2003).

1.2.1. Родина Steinernematidae

Самиці: великі, мінливі за розмірами. Кутикула гладенька або кільчаста. Латеральні поля відсутні. Екскреторна пора добре помітна. Головний кінець округлий чи затуплений, зрідка зміщений. Шість губ частково або повністю

зрощені, кожна з них з однією губною папілою, іноді з папілоподібними структурами біля основи. Мають чотири головні папіли. Амфіди малі. Стома западається. Хейлорабдіони яскраво виражені, формують кільце, схоже збоку на дві великі потовщені плями. Інші частини стоми формують асиметричну лійку з товстим переднім кінцем. Стравохід рабдитидний з дещо звуженим метакорпусом, з вузьким перешийком, оточеним нервовим кільцем, та великим базальним бульбусом зі скоротливим клапаном. Клапан між стравоходом та кишечником зазвичай добре розвинений. Хвіст коротший або рівний анальній ширині тіла, гострий, може бути з мукральним відростком. Присутнє постанальне розширення. Матка подвійна, амфідельфна, загнута. Вульва посередині тіла, іноді на підвищенні, з епіптигмою або без неї, симетрична. Гермафродитні та амфіміктичні самиці подібні між собою. Самиці яйцекладні або яйцеживородні, з личинками, що розвиваються до інвазійних стадій після виходу з тіла самиці. (Nguyen та Smart, 1996).

Самиці: Передній кінець зазвичай з шістьма губними папілами, чотирма великими головними папілами, та (часто) з біляротним диском. Сім'яник один, загнутий; добре помітне скупчення сперматозоонів перед спікулами; спікули парні; губернакулом довгий, іноді довший за спікули; бурса відсутня. Хвостовий кінець округлий, пальчастий, або загострений. Одна єдина або 10-14 пар генітальних папіл представлені разом з 7-10 парами передклоакальних (Nguyen та Smart, 1996).

Інвазійні личинки (ІЛ): стома западається. Тіло тонке, з чохликом (кутикули, що залишилася після другого линяння) або без нього. Кутикула кільчаста. Латеральні поля мають 4-9 вирізок та 3-8 гребенів. Стравохід має характерне відгалуження – бактеріальний везікулом; кишечник частково редукований, клітини стінок з добре помітними жировими краплинами, ректум закритий. Хвіст конусоподібний або ниткоподібний. Фазміди, що розміщені біля середини хвоста, – випуклі, мало помітні, або не спостерігаються (Nguyen та Smart, 1995).

1.2.2. Родина Heterorhabditidae

Гермафродитні самиці: розвиваються з ІЛ після їх проникнення до тіла хазяїна. Головний кінець вкорочений та трохи закруглений. Шість конічних губ добре розвинені, розділені, кожна з термінальною папілою; іноді в основі губ спостерігаються одна-дві малі виступаючі структури. Стома широка, але не глибока; хейлорабдіони формують кільце, що нагадує дві втягнуті плями при погляді збоку. Інші частини стоми зливаються і утворюють задню частину. Задній кінець стоми покривається стравоходом. Стравохід без вираженого метакорпусу; перешийок тонкий; базальний бульбус розширений із слабо розвиненим клапаном. Нервове кільце знаходиться посередині перешийка. Видільна пора зазвичай знаходиться ближче до кінця стравоходу. Вульва розміщена посередині тіла, щілиноподібна, симетрична або асиметрична, оточена еліптичними кільцями; матка амфідельфна, яєчник загнутий. Яйцекладна, згодом стає яйцеживородною. Хвіст гострий, може бути пальцеподібним, довший за ширину анального відділу; постанальне потовщення, зазвичай, присутнє (Nguyen та Smart, 1996).

Амфіміктичні самиці: подібні до гермафродитних, але менші за них; губні папіли випуклі. Статева система амфідельфна, вульва не придатна до відкладання яєць, але функціонує при спарюванні (Nguyen та Smart, 1996).

Самиці: сім'яник один, загнутий. Спікули парні, розділені, незначно зігнуті у вентральному напрямі. Голівка спікули коротка, відходить від пластинки при скороченні. Губернакулум складає зазвичай половину довжини спікул. Наявна бурса, пелодеральна, з дев'ятьма парами генітальних папіл (Nguyen та Smart, 1996).

ІЛ: Часто мають чохлик (кутикулу, що залишилася після другого линяння, і виконує захисну функцію при проникненні у тіло хазяїна). Ця оболонка має мозаїчну структуру та повздовжні гребені; кутикула посмугована та розділена на дві частини борознами на латеральних полях. Стома з випуклим дорсальним зубом. Рот та анальний отвір закриті. Стома являє собою закриту порожнину з паралельними стінками. Стравохід та кишечник частково

редуковані. Видільна пора позаду нервового кільця. Хвіст загострений (Nguyen та Smart, 1995).

1.3. Життєві цикли ентомопатогенних нематод

Викладено за (Burnell та Stock, 2000; Gaugler, 2002; Wojcik, 1986).

Життєвий цикл штейнернем починається з яєць, що розвиваються у тілі гермафродитної самиці в результаті злиття яйцеклітин та сперматозоонів, що продукуються гонадами самиці (синхронний гермафродитизм). Ембріони розвиваються в яйцях до II стадії розвитку личинок нематод, які вилуплюються. В подальшому, личинки II стадії розвитку харчуються вмістом тіла матері до 2-ї линьки (*endotokia matricida*), в процесі якої у них деградують внутрішні органи (клітини кишечника в значних кількостях накопичують жири, закриваються

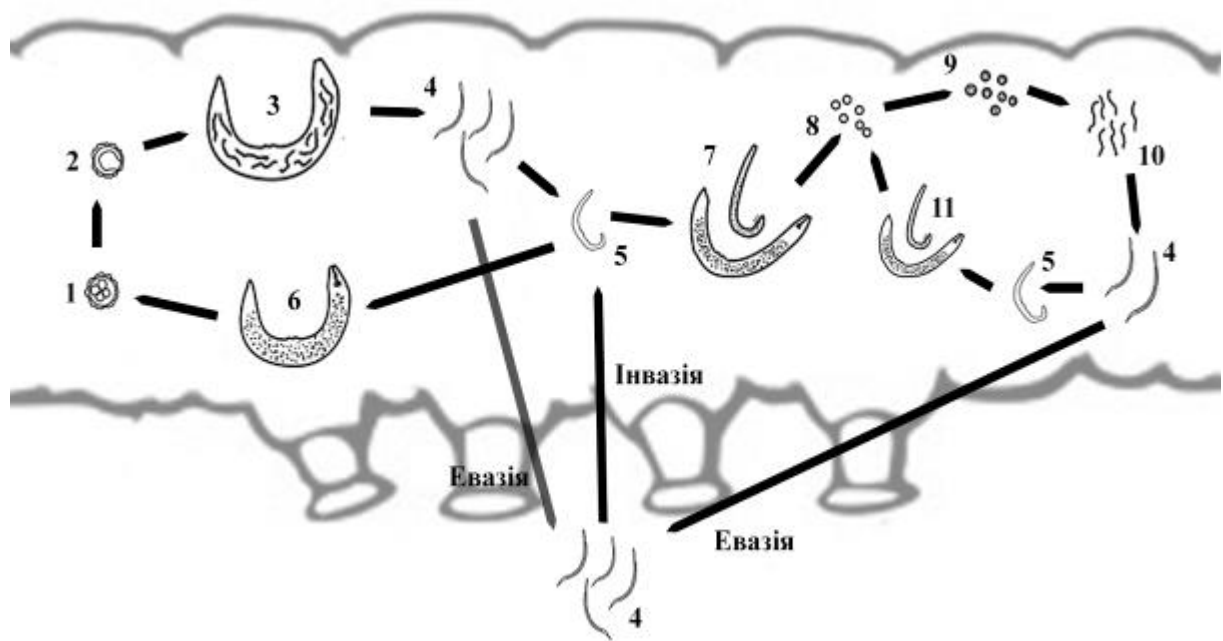


Рис. 1.5. Життєвий цикл ЕПН роду *Steinernema*. 1 – яйце з ембріоном, що розвивається в статевих шляхах самиці; 2 – яйце з личинкою I стадії; 3 – гермафродитна самиця; 4 – Dauer-личинка; 5 – личинка IV стадії з зачатками статевих органів; 6 – личинки II стадії, що живляться тканинами матері; 7 – амфіміктична самиця та самець I покоління; 8 – яйця, відкладені амфіміктичною самицею; 9 – яйця з лич. I стадії, що розвиваються в порожнині тіла комах; 10 – личинки II стадії, що розвиваються в порожнині тіла комах; 11 – самець та самиця II покоління (Оригінал).

анус та стома, формується бактеріальний міхурець), тобто з них формуються dauer-личинки, які у ЕПН виконують функції інвазивних. Dauer-личинки розривають оболонки тіла самиці та виходять назовні.

В тому випадку, якщо всередині ураженої комахи зберігаються поживні речовини у кількостях, придатних для подальшого розвитку паразитів, личинки проходять через IV стадію розвитку та перетворюються на амфіміктичних самиць та самців першого покоління, які розмножуються статевим шляхом.

Амфіміктичні самиці, на відміну від гермафродитних, мають менші розміри та здатні відкладати яйця. В залежності від кількості поживних речовин у комасі можуть утворюватися декілька наступних поколінь самців та амфіміктичних самиць. Перше покоління відрізняється найбільшими розмірами, нематоди наступних поколінь менші. З настанням дефіциту ресурсів та їх значним заміщенням метаболітами, що унеможлиблює подальший розвиток нематод, ІЛ активно покидають тіло комахи для пошуку нового хазяїна. Новий хазяїн заражається шляхом потрапляння ІЛ до порожнини тіла через дихальця, ротовий апарат та анальний отвір. Личинки можуть потрапляти до травної системи з їжею, звідти активно проникають до міксоцелю. З потраплянням до порожнини тіла комахи, ІЛ відригує з бактеріального везікулюму симбіотичних бактерій, які лізують не-кутикларизовані тканини хазяїна та постачають поживні речовини для паразитів. Личинка перетворюється на личинку IV стадії розвитку, яка вже має зачатки статевих органів. Після 4-ї линьки з личинок ЕПН формуються гермафродитні самиці або самці та амфіміктичні самиці першого покоління (Hirao, Ehlers та Strauch, 2010; Wouts, 1980).

Життєвий цикл ЕПН з роду *Heterorhabditis* відрізняється від ЖЦ *Steinernema* спрощеною схемою розвитку. Після інвазії та проходження через IV стадію розвитку з личинок формуються велетенські гермафродитні самиці, які відкладають яйця опісля самозапліднення. З яєць формуються самці та самиці, які можуть копулювати, але самиці не здатні відкладати яйця, тому ІЛ розвиваються з запліднених яєць всередині тіла самок та виходять зовні шляхом ендотокії (Zioni (Cohen-Nissan), Glazer та Segal, 1992).

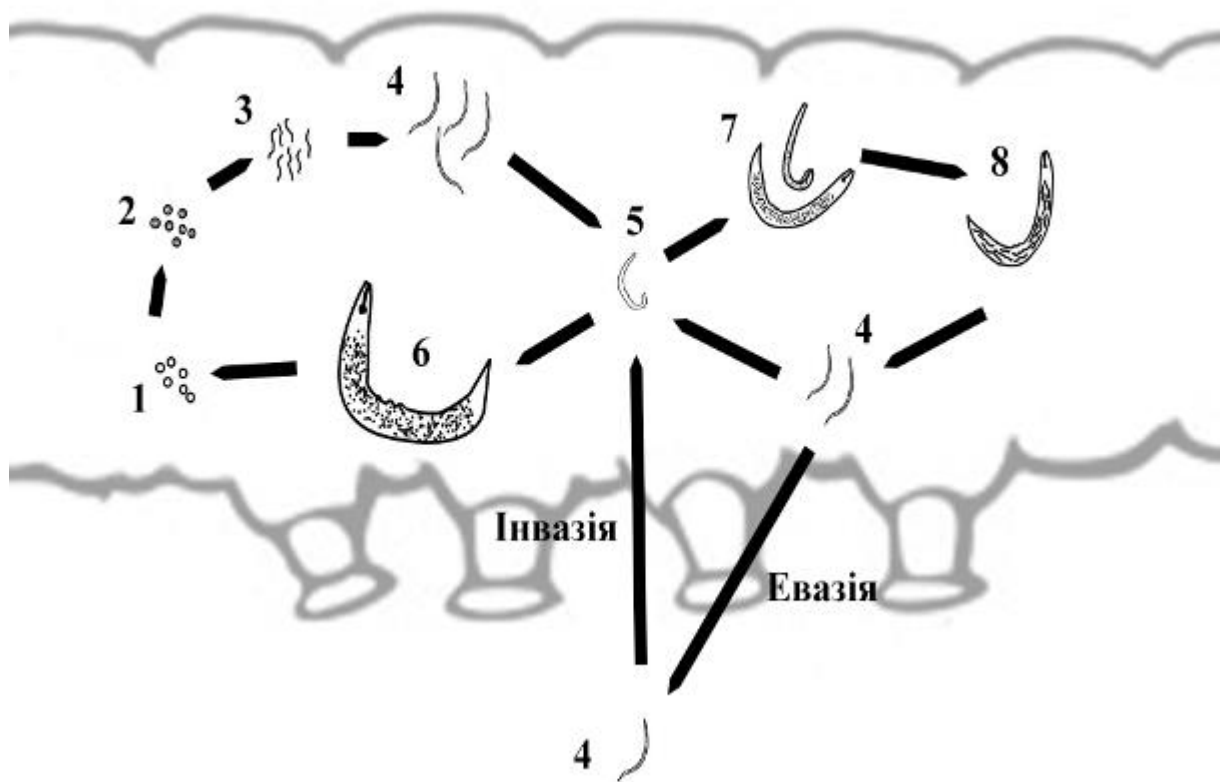


Рис. 1.6. Життєвий цикл ЕПН роду *Heterorhabditis*. 1 – яйця, відкладені гермафродитною самицею; 2 – яйце з личинкою I стадії; 3- личинки II стадії, що розвиваються в порожнині тіла комах; 4 – Dauer-личинка; 5 – личинка IV стадії з зачатками статевих органів; 6 – велетенська гермафродитна самиця; 7 – самець та амфіміктична самка; 8 – личинки II стадії, що живляться тканинами матері (Оригінал).

1.4. Перспективи дослідження ентомопатогенних нематод

Ентомопатогенні нематоди є важливими агентами біологічного контролю, – комплексу методів по використанню біологічних об'єктів (вірусів, бактерій, нематод, комах тощо) для контролю чисельності членистоногих (в основному комах), шкідливих для діяльності людини (Ehlers та Shapiro-Ilan, 2005). Розробки препаратів на основі даних біологічних об'єктів активно ведуться в провідних країнах Заходу, найперспективнішими вважаються саме ЕПН (Nazir та ін., 2003; Lasey та ін., 2001). Основними плюсами використання ЕПН в якості методу боротьби із комахами-шкідниками є:

- абсолютна безпечність при використанні для теплокровних хребетних тварин та незначна патогенність (в лабораторних умовах), – для амфібій;
- широкі кліматичні межі використання;
- широкі можливості для селективного відбору патогенних штамів ЕПН;
- можливість використання в сукупності з хімічними інсектицидами/нематоцидами та іншими об'єктами біологічного контролю (напр., патогенними грибками роду *Palaeomyces* Renault, 1896);
- зменшення хімічного навантаження на агрокультури та екосистеми, оскільки препарати на основі ЕПН не містять отрутохімікатів, застосовуються контрольовано та не потребують повторних внесень на сезон;
- значна ефективність окремих штамів ЕПН до основних видів шкідників (до 100 % відмирання дорослих стадій розвитку шкідників при застосуванні проти личинок) (Georgis та ін., 2006);
- високі індекси летальності по відношенню до комах-шкідників (Дрегваль та ін., 2008; Климов и др., 2010).
- можливість використання в якості видів-індикаторів стану екосистеми.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. 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 ПЗ (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.).

Температура та відносна вологість повітря на момент відбору проб реконструювалися за допомогою інтернет-ресурсів Meteo.ua та Meteopost (Meteo.ua, 2015; Meteopost, 2015) та наведені у Таблиці 2.1.

Таблиця 2.1.

Умови відбору проб та біогеографічне зонування для виділених ізолятів.

Вид	Ізолят	Степ	Лісостеп	Гори	Т пов., °С	В пов., %	Ґрунт
<i>S. feltiae</i>	Kan	—	●	—	18	38	Підстилка
	Gol-2	—	●	—	25	54	Дерновий підзолистий
	Gol-3	—	●	—			
	Gol-7	—	●	—			
	KM	●	—	—	39	15	Звичайний чорнозем
	DONR	—	●	—	38	18	Дерновий підзолистий
	Ask-6-2	●	—	—	25	41	Темно-каштановий
	Ask-12	●	—	—			
	Kar-4	—	—	●	30	36	Бурий гірсько- лісовий
	Kar-13	—	—	●			
<i>S. arenarium</i>	IR	●	—	—	38	24	Дерновий піщаний
	CH	—	●	—	17	98	Дерновий підзолистий
<i>Steinernema</i> sp.	U2	—	—	●	—	—	Підстилка

2.2. Фізико-географічна характеристика району досліджень

Викладено за (Маринич, Пашенко та Шищенко, 1985). Карту ґрунтів та середньорічну температуру повітря див. у Додатках.

2.2.1. Зона мішаних лісів

Займає північну частину України, знаходиться в Поліській низовині, та складає 20 % території. Характерними рисами є: низовинний рельєф, в складі якого значну роль відіграють піщані та піщано-глинисті антропогенні відкладення, густа річна сітка з широкими заболоченими річковими долинами, позитивний баланс вологості, високий рівень ґрунтових вод, переважають дерновинно-підзолисті та болотні ґрунти (іноді зустрічаються лесовидні суглинки та сірі лісові ґрунти), значно поширені соснові ліси з часткою широколистяних порід.

Річна сумарна сонячна радіація складає 3800-4000 МДж/м², радіаційний баланс за рік – 3140 МДж/м². Середня температура січня змінюється з заходу на схід від -4,5 до -8,0 °С. Середня температура липня складає +18 °С. Вегетаційний період продовжується із другої декади квітня до третьої декади жовтня. Термін безморозного періоду 160-180 днів зі сходу на захід.

В середньому за рік випадає 600-700 мм осадів. Коефіцієнт зволоження змінюється від 2,6 на заході до 1,9 на сході. Більшість осадів випадає в період з квітня по жовтень. Висота сніжного покриву складає від 15 до 35 см, промерзання ґрунту сягає 40-50 см. Водоносний горизонт знаходиться на рівні 0,5-8,0 м.

Дерновинно-підзолисті та болотні ґрунти займають 95 % території Українського Полісся. Також зустрічаються перегнійно-карбонатні, сірі лісові ґрунти, опідзолені чорноземи. Дерновинно-підзолисті ґрунти поділяються на дерново-слабопідзолисті (зандрові рівнини та річкові тераси; частка гумусу 0,5-1,3 %, гумусовий горизонт 12-18 см) та дерновинно-середньопідзолисті (розміщені на водорозділах; підвищена кислотність), поширеними є дерновинно-підзолисті глеюваті та глейові ґрунти. На лівобережжі Дніпра, в річкових долинах та пониженнях зустрічаються засолені та солонкуваті дерновинно-глейові та

лугові ґрунти. Болотні ґрунти займають сучасні та древні долини та котловини, а також мікро- та макропониження на водорозділах. Крупні масиви болотних ґрунтів розміщені на Волині та Рівненщині, північно-західній частини Житомирської області та подекуди на Чернігівщині.

Сучасна флора Полісся налічує 1998 видів рослин (1403 – природна флора). Покритосім'яні рослини домінують – 97,1 % всіх видів. Головні типи рослинності – лісова (30 % території, основні породи – сосна (57,4 %), дуб (20,6 %), береза (10,2 %), вільха (6,3 %), осина (2,3 %), граб (2,0 %)), лучна, болотяна. Кількість дубових лісів зменшується з заходу на схід від 11 до 7 %. Сосново-дубові ліси займають найбільші площі, ростуть на дерновинно-підзолистих ґрунтах та поділяються на грабові (Волинська обл., Житомирська обл.), липові (лівобережжя Дніпра) лещовинні, крушинові, рододендрові. На північному заході Полісся зустрічаються ялинові ліси (з сосною та вільхою).

Луки займають 10 % території Полісся, розміщуються в поймах рік. На луках переважають вологі дерновинні та лучні ґрунти. В рослинності переважають різнотравно-злакові види.

Низовинні болота займають 80 % території боліт. Вони представлені трав'яними, трав'яно-моховими та лісовими болотами.

2.2.2. Лісостепова зона

Лісостепова зона простягається від Передкарпаття до західних відрогів Середньоруської височини та займає 34 % території України. Лісостепова зона займає території Тернопільської, Хмельницької, Вінницької, Черкаської, Полтавської, Харківської, більшу частину Сумської, південь Львівської, Волинської, Рівненської, Житомирської, Київської, північ Одеської та Кіровоградської, частково Івано-Франківської та Черновицької областей.

Виділяють типи ландшафтів: 1) широколистяно-лісові з сірими і тамено-сірими лісовими ґрунтами (західна частина зони); 2) лісостепові з опідзоленими і реградованими чорноземами, з фрагментарними широколистяними лісами; 3) лучно-степові з типовими чорноземами, лучно-чорноземовими ґрунтами; 4) лучні; 5) болотяні.

Зона характеризується тим, що первинні ліси та лучні степи мало збереглися, – оранки займають 70-80 % сільськогосподарських угідь, а залісненість складає в середньому 12,5 %.

Річна сумарна сонячна радіація складає 3900-4200 МДж/м², радіаційний баланс за рік – 1825 МДж/м². Середня температура січня змінюється з заходу на схід від -4 до -8 °С. Середня температура липня складає +18 °С. Термін безморозного періоду 135-140 днів зі сходу на захід.

В середньому за рік випадає 500-600 мм осадів. Коефіцієнт зволоження змінюється від 2,8 на заході до 1,2 на сході. Більшість осадів випадає в період з квітня по вересень.

Для лісостепової зони характерний мозаїчний ґрунтовий покрив, що утворюється за рахунок опідзолених та типових чорноземів (характеризуються великою потужністю гумусного профілю – 120-130 см), темно-сірих, світло-сірих ґрунтів різного рівня опідзоленості, чорноземними та темно-сірими реградованими, лучно-чорноземними ґрунтами.

В лісостеповій зоні переважають широколистяні, широколистяно-соснові та соснові ліса, лучні степи та остепнені луки, болота та пойменні луки. Залісненість на 1985 рік складала 11 %. В деревостанах переважають дуб (43 %), граб (10 %), бук (5 %), сосна (3 %), вільха (3 %), береза (3 %) та ін.

2.2.3. Степова зона

Простягається з Південного Заходу на Північний Схід України та складає 40 % території України. Степова зона знаходиться на території Одеської, Миколаївської, Херсонської, Дніпропетровської, Запорізької, Донецької, Луганської, областей та південних частин Кіровоградської, Харківської областей та рівнини АР Крим.

Кліматичні умови степів України м'якші, ніж у степах Східної Євразії. У степовій зоні рівнинної частини України найбільші теплові ресурси, найдовший вегетаційний період, найнижча зволоженість. Річна сумарна сонячна радіація змінюється від 4100 на півночі до 5230 МДж/м² на півдні зони. Річний радіаційний баланс становить 1900-2210 МДж/м². Середня температура в січні -2 -

9°C, липні +20-24°C. Сума середньодобових температур за період із стійкою температурою вище 10 °C становить 2800-3600 °C, Безморозний період триває 220 днів на заході зони, 150 – на північному сході, вегетаційний період триває 210-245 днів. Річна сума опадів змінюється від 450 мм на півночі зони до 350-300 мм в Причорномор'ї. Максимум опадів випадає в першій половині літа. Разом з тим часті весняно-літні посухи, особливо на південному сході зони. Сніговий покрив нестійкий, взимку звичайні відлиги. Для степової зони характерна висока випаровуваність – 900-1000 мм/рік.

Серед ґрунтів переважають звичайні (6-9 % гумусу) та південні (5-6 %) чорноземи, що займають близько 90 % площі зони. У Причорномор'ї розвинені темно-каштанові (3-5 % гумуса), а на пониженнях плакорів - каштанові ґрунти (2-3 % гумусу). В комплексі з ними зазвичай зустрічаються солонці. В подах сформувалися глеє-солоді та солончаки.

В природному рослинному покриві степової зони переважає трав'яниста рослинність - головним чином багаторічні сухолюбиві трави (дерновинні злаки - ковила, типчак, на півночі зони – кореневищні злаки). Різотрав'я зазвичай має підлегле значення. За рахунок збідніння різотрав'я відповідно до зменшення зволоження і зростання теплозабезпеченості відбувається флористичне спрощення більш південних степів. Природна рослинність степів збереглася переважно в державних заповідниках.

2.2.4. Українські Карпати

Українські Карпати – частина Східних Карпат, фізико-географічна провінція Карпатської гірської країни. Вони поширюються в довжину з Північного Заходу на Південний Схід на 280 км, а у ширину – з Північного Сходу на Південний Захід на 100-110 км.

Українські Карпати займають територію Закарпатської області, значну частину Івано-Франківської, Львівської, Черновицької областей.

Кліматичні умови Українських Карпат визначаються гірським рельєфом, характер якого відображається у взаємодії радіаційних і циркуляційних процесів. Річна сумарна сонячна радіація в Предкарпатті та Закарпатській низовині складає

4000-4100 МДж/м², а радіаційний баланс - 1800-1830 МДж/м². З підняттям в гори значення останнього зменшуються на 25-30 %. Рельєф визначає вертикальну кліматичну зональність. Так, середні температури січня у Предкарпатті -4, -5 °С, Закарпатті -3 °С, а у горах -6 ... -12 °С. Зима м'яка, багатосніжна, нерідко з тривалими відлигами, особливо в Закарпатті. У горах спостерігаються температурна інверсія. Тривалість зими в Закарпатті до двох з половиною місяців, а у горах на висоті 850 м – 4 місяці. Літо нежарке, з дощами. Середні температури липня в Предкарпатті 18-19 °С, Закарпатті 20, у горах 7-13 °С. З підняттям на кожні 100 м в Карпатах літо спізнюється на 8-10 днів і на 5-6 днів раніше закінчується, тому починаючи з висоти 850-900 м літній період не фіксується. Гори і передгір'я надмірно зволожнюються. За рік в передгір'ях випадає 800-1000, а у горах 1500-1600 мм осадів.

В Українських Карпатах проявляється вертикальна поясність ґрунтового покриву. Вона неоднакова на південно-західних і північно-східних схилах. У Предкарпатті в умовах достатнього зволоження на тяжких делювіальних суглинках сформувалися дерновинно-підзолисті поверхнево-оглеєні ґрунти. Вище (до 1200-1400 м) поширені бурі гірсько-лісові ґрунти, На низькогірських хребтах розвинені бурі лісові ґрунти, що мають потужний профіль з ознаками опідзолення. На крутих схилах Полонинського хребта бурі ґрунти неопідзолені, щебнисті, слабкорозвинені. Під буковими і ялиново-буковими лісами сформувалися сіро-бурі ґрунти. Вище 1600 м під субальпійськими луками розвинені гірсько-лучні, місцями гірсько-торфові ґрунти. На південно-західних передгір'ях в умовах теплого і вологого клімату, глибокого промивання ґрунтового покриву сформувалися буроземно-підзолисті ґрунти. В Закарпатській низовині в умовах неглибокого залягання ґрунтових вод та достатнього атмосферного зволоження під первинною лучною рослинністю та вторинними дубравами розвинулися дернові опідзолені ґрунти

Українські Карпати належать до Центрально-Європейської провінції Європейської широколистяної області. Це найбільш лісиста територія країни. Тут зосереджено 20 % лісів України. У Українських Карпатах ялиця займає 41 %

покритої лісами площі, бук 35 %; решта пород покривають менші площі: дуб 9, ялина 5, граб 4 %. Такі породи, як береза, клен, ясен, вільха, займають 6 % лісової площі. В Українських Карпатах виділяються висотні пояси рослинності: передгірний дубовий, низькогірний буковий, верхній гірський ялицевий, субальпійський чагарниково-лучний, альпійський. В передгірному поясі (висоти 400-700 м) переважають діброви, поширені також ялицево-букові ліси та вторинні грабінники, бучини, яличники, осиково-вільхові ліси. У низькогірному поясі (на різних схилах він піднімається від 500-700 до 1000-1200 та 1350-1400 м) домінують високостовбурні бучини, ялицево-букові, грабово-букові та дубово-букові ліси. В поясі ялицевих лісів (верхня межа сягає висот 1350-1500 м) переважають вологі чисті сурамені і буково-ялицеві сурамені. Чисті ялицеві ліси займають верхні частини схилів Чорногори, Рахівських і Чивчинських гір, Горган. У субальпійському поясі (висоти 1200-1500, 1050-1850 м) представлені зарості гірської сосни, ялівець, вільха зелена, рододендрон східнокарпатський, злакові та різнотравні луки. До альпійському поясу (вище 1800-1850 м) належать трав'янисті і чагарникові спільноти, які поширені фрагментарно.

2.2.5. Кримські гори

Кримські гори знаходяться на Півдні Кримського півострова. Вони простягаються вздовж Чорного моря на відстань 150 км від мису Херсонес до мису Ілья у м. Феодосія.

Область в середньому на 1,5-3,0 °С тепліша за інші місцевості, що знаходяться в континентальних умовах відповідних широт. Характерна особливість клімату – збільшення з висотою кількості годин сонячного опромінення. Річна сумарна сонячна радіація складає 5321-5928 МДж/м², 60 % якої припадає на пряму радіацію. Річний радіаційний баланс складає 2640 МДж/м². Весною та влітку внаслідок проникнення тропічних повітряних мас в Криму переважає сонячна погода. Восени та взимку в зв'язку з циклонічною діяльністю на полярному фронті формується хмарна погода, випадає значна кількість опадів. Річні суми опадів в горах складають 900-1100, в передгір'ях – 500-600 мм.

У розподілі ґрунтово-рослинного покриву Кримських гір проявляється вертикальна поясність. Передгір'я представляють мозаїчне чергування степових ландшафтів з щебенчастими карбонатними черноземами схилів з переважно дубовими порослевими лісами на щебенчастих дерново-карбонатних ґрунтах. Схили головної гряди зайняті переважно дубовими і буковими лісами, частково сосновим лісом на щебенчастих бурих гірськолісових ґрунтах. На Південному березі Криму ростуть сухі ліси і чагарники середземноморського типу на гірських коричневих ґрунтах. Головна гряда покрита лучно-степовою рослинністю на гірсько-лучних чорноземновидних ґрунтах і гірських чорноземах.

У Кримських горах переважають низько- і середньогірські, грядово-котловинні та прибережно-схиліві підкласи ландшафтів з добре вираженою вертикальною поясністю. На куєстових грядках поширені передгірні степові, лісостепові і широколистяно-лісові ландшафти. На північному макросхилі сформувалися низькогірні лісолучні (дубово-лучні), середньогірні широколистяно-лісові (дубові) і шпильчаково-широколистяні (буково-соснові) ландшафтні комплекси. В нижньому ландшафтному поясі середньогір'я широко представлені улоговинний вторинний лісостеповий і гірсько-долинний види ландшафтів. Улоговинні ландшафти зустрічаються в південно-західній і північно-східній частинах Кримських гір. На південному макросхилі (абсолютні висоти до 400-450 м) поширені субсередземноморські ландшафти з лісами з дуба пухнастого, грабінника з ялівцевими рідколіссями на крутих кам'янистих схилах. Вище (висоти до 800-950 м) зформувались субсередземноморські ландшафти з лісами з сосни кримської, дуба пухнастого і скельного. Серед них у вигляді островів поширені ландшафти з грабово-буковими лісами на бурих гірсько-лісових ґрунтах. У середньогірському поясі (висоти 1000-1300 м) розвинені широколистяно-лісові (букові, грабово-букові, грабові і дубові ліси), шпильчаково-лісові круто-схиліві ландшафти. Вище знаходяться закарстовані яйлинські ландшафти – гірсько-лукові степи з трав'янистою, напівчагарниковою та чагарниковою рослинністю, з різноманітними карстовими формами.

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Відбір проб

Методи відбору проб для виявлення ЕПН широко представлені у (Марчук та Савчук, 2008). До них можна віднести:

1. Безпосередній відбір ґрунту (Марчук та Савчук, 2008; Bedding та Akhurst, 1975). Проби відбирали на елементарній ділянці випадково або систематично за маршрутом дослідження з глибини 5-10 см від поверхні. Проби ґрунту були точковими або об'єднаними (коли декілька проб з різних точок відбору з однієї типової ділянки змішуються разом). Об'єм кожної проби 250-300 см³. Місце відбору проби ґрунту та координати точок відбору визначали та фіксували за допомогою GPS-приймача. До кожної проби ґрунту заповнювали супровідний листок, в якому фіксували порядковий номер, календарну дату, тип ґрунту, тип рослинності, ступінь зволоженості проби на момент відбору.

2. Метод ґрунтових пасток (Данилов, 2005). Для цього личинок обраного виду тест-комах вміщували у сітчасту капсулу та закопували на глибину до 10 см у ґрунт на пробному майданчику. Капсулу виготовляли з верхньої частини мікропробірки об'ємом 1,5 мл та нержавіючої металевої сітки, попередньо позбавленої технічного мастила.

3.2. 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. До проби вміщували дві личинки тест-комах (див. наступний параграф), як правило, старших поколінь великої воскової молі, *Galleria mellonella* (Linné 1758) або личинок мучного хрущака, *Tenebrio molitor* Linné 1758), у сітчастій капсулі. В разі необхідності, ґрунт помірно зволожували за допомогою розбризкувача.

Проби експонували 5 днів та перевіряли на зараження. Личинок тест-комах з явними ознаками нематодного ураження – почервоніння тулуба, місцеве або сегментарне почорніння, знерухомлення зі збереженням відносного тургору –

відмивали 10-15 секунд у 70 %-ному етиловому спирті та переносили на пастки Уайта (чашки Петрі з годинниковими скельцями з фільтрувальним папером, постійно змоченим 0,001 %-ним розчином формаліну у фізіологічному розчині). При негативному результаті пробу експонували ще 5 днів. Пастки Уайта витримували за кімнатної температури в темному приміщенні, або при розсіяному світлі. Контамінацію грибками обов'язково усували шляхом механічної або хімічної обробки.

3.3. Культивування тест-комах

Тест-комахи – це комахи, які використовуються в якості моделей для виділення, культивування та проведення експериментальної роботи з ентомопатогенними нематодами. Тест-комах відбирають за наступними критеріями: сприйнятливість до проникнення в організм комахи ЕПН та розвитку патогенного процесу, можливість швидкої репродукції в лабораторних умовах із зменшенням витрат на годування.

В якості тест-комах використовували личинок великої воскової молі *Galleria mellonella* L. та великого мучного хрущака *Tenebrio molitor* L. (Стефановська, 2007). Велика воскова міль широко використовується в світовій практиці в якості тест-комахи для вивчення ентомопатогенних грибів, вірусів, бактерій, найпростіших та нематод, проте її утримання вимагає чіткого дотримання температури, режиму вигодовування та перешкоджання потрапляння до культури вищезазначених патогенів. Так, потрапляння до лабораторної культури галерії споровиків з роду *Nosema* (Nägeli, 1857) спричиняє її повне винищення і унеможливорює відтворення внаслідок забруднення поверхонь, контейнерів та кормів спорами. Великий мучний хрущак легкий у розведенні та утриманні, проте є менш сприйнятливим до зараження ентомопатогенними організмами, що вимагає збільшення витрат часу на виділення культур ЕПН.

Для розведення воскової молі використовували термостати з температурою в робочій камері 38 °С, для вигодовування личинок використовували спеціальні суміші (Meyling, 2007).

3.4. Культивування ентомопатогенних нематод

Після початку міграції нематод зливали разом з розчином у окремий посуд, де зберігали, підтримуючи постійний рівень розчину та з періодичним очищенням від загинлих личинок, за температури 4 °C, до півроку (Веремчук, 1972); у чашки Петрі доливали новий 0,001 %-ний розчин формаліну у фізіологічному розчині. Для зберігання ІЛ ЕПН також застосовували пористі матеріали з діаметром пор 0,5-0,7 мм, змочені стерилізованою проточною водою або фізіологічним розчином, в скляному посуді з отворами для аерації. ІЛ перед зберіганням омивали 0,1 %-ним розчином натрієвої солі мертиоляту (тимеросал, орто-етилртутьсаліцилат натрію, $C_9H_9HgNaO_2S$).

Отримані культури ЕПН розмножували на личинках тест-комах.

Зараження комахи здійснювали в попередньо простерилізованих чашках Петрі з сухим фільтрувальним папером, на якому розміщували личинок тест-комах. Попередньо їх анестезували ефіром протягом 30 секунд. Для зараження, комах обприскували суспензією нематод з відомою кількістю личинок для досягнення концентрації 100 ІЛ/комаху. Чашки Петрі з зараженими тест-комахами витримували при 22-25 °C до евазії інвазійних личинок (Веремчук, 1972). Після чого проводили збір культури. Для збільшення ефективності зараження, личинок тест-комах поміщали у попередньо підготовлені мікропробірки на 2 мл (з отворами для вентиляції та згорнутим фільтрувальним папером, або простерилізованим піском), та обприскували суспензією нематод. Знерухомлені таким чином личинки комах знаходяться в постійному тісному контакті з ІЛ.

3.5. Виявлення ентомопатогенних нематод за ознаками зараження тест-комах

Інвазійна личинка ЕПН заражає комаху через тонкі ділянки кутикули, анальний отвір, отвори дихалець, або з їжею. Візуально даний процес проявляється як точкове почорніння кутикули чи отворів дихалець комахи в місцях проникнення. В подальшому, личинка воскової молі швидко втрачає свою

рухливість і муміфікується. Вже на першу добу після зараження внутрішні органи гусені змінюють колір в залежності від виду бактерії-симбіонта.

Бактерії роду *Xenorhabdus* продукують пігменти чорного та темно-коричневого кольору, а бактерії роду *Photorhabdus* – флуоресцентно-активні пігменти різних відтінків червоного. На даному етапі колір пігменту служить таксономічною ознакою, оскільки симбіотичні бактерії є родо- та видоспецифічними до ентомопатогенних нематод, і за характером ураження та зміни зовнішнього виду мертвої комахи можна встановити, яким саме родом ЕПН уражений хазяїн.

3.6. 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 (10,93 г NaCl, 1,57 г KCl, 0,83 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,83 г $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ на 1 л дистильованої води) (Nguyen та Hunt, 2007) на предметному скельці, накривали покривним скельцем та вбивали витримуванням препарату при 65-70°C протягом 7-10 секунд, до повного знерухомлення об'єктів. Виготовлений таким чином тимчасовий препарат придатний до дослідження нативного забарвлення нематод, морфологічних особливостей будови генітального апарату, морфометрії.

Для виготовлення постійних препаратів ЕПН, нематод фіксували у нагрітому до 65-70 °C одинарному ТАФ (2 мл триетаноламіну, 7 мл 40 % розчину формальдегіду на 91 мл дистильованої води) та витримували у закритому від прямих сонячних променів місці протягом доби. Після цього, нематод відмивали у дистильованій воді та поміщали у розчин Зайнхорста №1 (95 %-ний етиловий спирт, гліцерин та дистильована вода у співвідношенні 20:1:79) та витримували 12 годин, після чого переміщали до розчину Зайнхорста №2 (95 %-ний етиловий спирт та гліцерин у співвідношенні 95:5) і у чистий гліцерин (Seinhorst, 1959). Прийнятною є також спрощена схема, за якою нематод із фіксатора переносили до розчину дистильованої води, етилового спирту та гліцерину (у співвідношенні

6:3:1 (пропорційно), або 25:75:5 (у мл)) та витримували за кімнатної температури до випаровування спирту, після чого переносили до чистого гліцерину (Рубцов, 1978). Дана методика модифікована мною для покращення процесу мікроскопіювання. Нематоди з фіксатора переносили до 2 мл суміші з 1 мл розчину фуксину у гліцерині (щіпка кислого фуксину на 85 мл дистильованої води та 15 мл гліцерину) та 1 мл дистильованої води, 95 %-ного етилового спирту та гліцерину (25:75:5 (у мл)). Кислий фуксин добре розчиняється у спирті та фарбує цитоплазму клітин і органели з основною реакцією і не блокує нативне зображення кутикулярних структур, що дозволяє контрастувати деталі внутрішньої будови нематод, ядра та межі клітин.

Після випаровування спирту нематод переносили до розчину гліцерину у воді у співвідношенні 1:2 з додаванням кількох кристалів фенолу на 15 мл розчину. Для цього, на обезжирене предметне скельце наносили 32 мкл даного розчину для перенесення самців, 50 мкл для перенесення самиць (з розміщенням по краям поля скалок покривного скельця) та 20 мкл для перенесення ІЛ. Краплину з поміщеними до гліцерину нематодами накривали покривним скельцем та закривали лаком. Виготовлений подібним чином постійний препарат придатний до зберігання протягом 3-4 років.

Для фіксації нематод придатний нагрітий до 60-65 °C 70 %-ний етиловий спирт та, для молекулярно-генетичного аналізу, 96 %-ний етиловий спирт,. Нематоди, фіксовані в ТАФ для подальших генетичних досліджень не придатні.

3.7. 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 $\times 200-400$. Для покращення контрастності використовували зелений, блакитний або сірий світлофільтри.

Рисунки нематод виконували у програмі Adobe Photoshop CS3-CS6 по фотографіях 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 та Köhler, 1955).

Вимірювання ЕПН починали з вимірювання ІЛ. Вимірювали такі параметри:

L – загальна довжина тіла;

W – діаметр тулуба;

T – довжина хвоста, що вимірюється як відстань від анального отвору до кінця хвоста;

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.

На основі даних морфометричних показників вираховували:

Індекси де Мана: $a=L/W$; $b=L/ES$; $c=L/T$;

Коефіцієнти: $D\%=EP/ES\times 100$; $E\%=EP/T\times 100$.

Для визначення морфометричних показників самців ЕПН відбирали самців І та ІІ поколінь. У самців відмічаються колір спікул та губернакулуму, наявність мукрального шипа та його довжина, посмертна форма заднього кінця тіла, форма хвоста.

У самців вимірювали такі показники:

L – загальна довжина тіла;

W – діаметр тулуба;

GL – довжина губернакулуму;

SL – довжина спікул;

EP – відстань від головного кінця до екскреторної пори;

ES – загальна довжина стравоходу;

NR – відстань від головного кінця до нервового кільця;

T – довжина хвоста, що вимірюється як відстань від клоаки до кінця хвоста;

CBD – діаметр тіла на рівні клоаки.

На основі даних морфометричних параметрів вираховували коефіцієнти $GS\% = GL/SL \times 100$, $SW\% = SL/CBD \times 100$ та $D\%$.

Для визначення морфометричних показників самиць ЕПН відбирали самиць I та II поколінь. У самиць відмічали симетрію та форму вульви, форму хвоста, форму постанального розширення.

У самиць вимірювали такі показники (рис. 3.2):

L – загальна довжина тіла;

W – діаметр тулуба;

ES – загальна довжина стравоходу;

EP – відстань від головного кінця до екскреторної пори;

ABD – діаметр тіла на рівні анусу;

T – довжина хвоста, що вимірюється як відстань від анального отвору до кінця хвоста;

V – дистанція від апікального кінця до вульви.

На основі даних морфометричних параметрів вираховували коефіцієнти $D\%$ та індекс $V\% = V/L \times 100$.

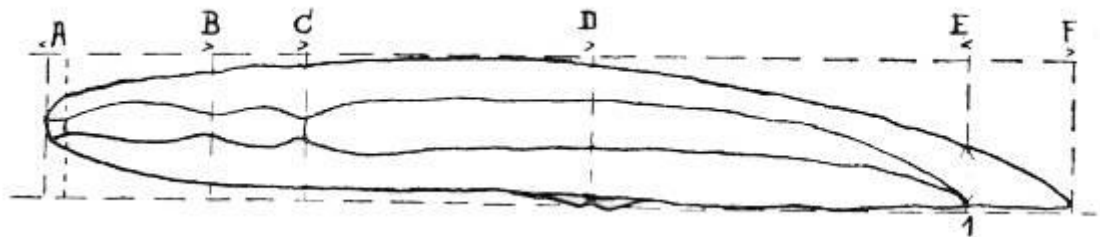


Рис. 3.1. Схема вимірів самиць ЕПН. А – глибина стоми; В – відстань від головного кінця до нервового кільця; С – відстань від головного кінця до екскреторної пори; D – дистанція від апікального кінця до вульви; E – довжина хвоста, що вимірюється як відстань від анального отвору до кінця хвоста; F – довжина тіла; 1 – діаметр тіла на рівні анусу. Подано за Вейзером (Weiser, 1955), модифіковано.

3.8. 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. Надалі в тексті морфометричні параметри та коефіцієнти наведені у формі «Параметр $\pm$ СКВ (мін.-макс.)».

На основі отриманих морфометричних параметрів було проведено кореляційний аналіз канонічних змінних номінальних параметрів з модуля «Discriminant Function Analysis» програми Statistica. Для канонічних коренів із найбільшою значимістю було побудовано графіки канонічних кореляцій. Процес аналізу, результати та їх оцінення висвітлено у підрозділах «4.2.3. Морфологічна мінливість ізолятів *Steinernema feltiae*» та «4.4. Вплив температурного фактору на мінливість ентомопатогенних нематод».

3.9. Молекулярно-генетичні дослідження

3.9.1. Підготовка до полімеразно-ланцюгової реакції. Екстракція ДНК

Для молекулярно-генетичного аналізу використовували ІЛ або самиць (F1 або F2) ентомопатогенних нематод, суправітально, або зафіксованих у 96 %-ному етиловому спирті у разі потреби подовженого зберігання матеріалу, втрати культур і т.і. В разі використання фіксатора, нематод витримували у дистильованій воді протягом доби, «відмивали» від залишків етилового спирту, оскільки останній може депресувати процес виділення ДНК. 10-15 інвазійних личинок, або 1-2 самиці поміщали до мікропробірки на 200 мкл на льоду з 20 мкл лізуючого буферу для нематод, який готується перед поміщенням нематод за схемою (в розрахунку на 1 реакцію):

I. 17,7 мкл бідистильованої води, 2 мкл 10 $\times$ ПЛР буферу з коров'ячим сироватковим альбуміном (BSA) та концентрацією MgCl₂ 20 ммоль/мл (вир. TopBio), 0,2 мкл 1 %-го розчину Tween-20 (естер поліоксиетилен сорбітолу,

C₅₈H₁₁₄O₂₆, в-ва Sigma®) та 0,1 мкл розчину Протеїнази К (>600 АО/мл, в-ва Qiagen), на льоду.

II. 17,7 мкл бідистильованої води, 1,6 мкл розчину MgCl₂ (25 ммоль/мл), 0,4 мкл коров'ячого сироваткового альбуміну (BSA) (10 мг/мл), 0,2 мкл 1 %-го розчину Tween-20 та 0,1 мкл розчину Протеїнази К.

До мікропробірки з контрольною сумішшю клітинний матеріал не додавали.

Після додавання клітинного матеріалу суміш підлягала обробці на водяній бані протягом 1 години при 65 °С для ферментативного руйнування клітин та вивільнення нуклеїнових кислот. За годину, суміш обробляли 10 хвилин за температури 95 °С для руйнування ферменту та центрифугували 2 хвилини при 11,6×10³ об./хв.

III. 34,65 мкл попередньо підготованого розчину 0,05 г хелатуючої смоли Chelex® 100 (стирен-дивінілбензену кополімер, що містить парні йони імінодіоцтової кислоти, в-ва фірми BioRad Lab.) у 1 мл бідистильованої води, 0,35 мкл розчину Протеїнази К.

Після додавання продукту суміш обов'язково ретельно перемішували на апараті Вортекс. Суміш витримували 20 хвилин при температурі 56 °С, 10 хвилин при температурі 100 °С та центрифугували 2 хвилини при 11,6×10³ об./хв.

Готовий продукт використовували одразу або зберігали до ампліфікації при температурі -20 °С.

3.9.2. Полімеразно-ланцюгова реакція. Ділянка геному НТД 1–5.8S–НТД 2 (ITS1-5.8S-ITS2)

Для реакції ампліфікації використовували 1 мкл супернатанту екстракту ДНК та 11,1 мкл (I) або 24 мкл (II) ПЛР-суміші, приготовану перед використанням, змішування компонентів проводили на льоду. До складу ПЛР-суміші входять (в розрахунку на 1 реакцію):

I. 7,25 мкл бідистильованої води, 1,25 мкл 10× Taq-буферу (ТорВіо), 1 мкл суміші дезоксирибонуклеотид трифосфату, дНТФ (ПЛР дНТФ-суміш 10 мМ, ТорВіо), по 0,75 мкл кожного праймеру (концентрація кожного 20 рМ/μl), для ВТВ1-5.8S-ВТВ2-ділянки застосовуються наступні праймери: 18S 5'-TTG ATT

ACG TCC CTG CCC TTT-3' (прямий), 28S 5'-TTT CAC TCG CCG TTA СТА AGG-3'(зворотній), відповідні до позицій між 2503-2532 та 3774-3794 пар основ сіквенсу рДНК *Caenorhabditis elegans*; або, якщо попередні два не працюють, два наступні: TW81 5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC-3'(прямий), AB28 5'-АТА TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3' (зворотній). На льоду до даної суміші додавали 0,1 мкл Taq ДНК-полімерази (концентрація 5 Од/мкл). До контролю праймери не додавали.

II. 17,8 мкл бідистильованої води, по 0,5 мкл кожного з праймерів, та на льоду,- 5 мкл готового MyTaq™ Red Reaction Buffer (в-ва фірми BioLine), 0,2 мкл MyTaq™ Red DNA Polymerase (в-ва фірми BioLine).

Підготовлену до ПЛР суміш запускали в циклічний процес за схемою:

I.1 цикл 94 °C 7 хв., 35 циклів для першої пари праймерів або 40 для другої пари праймерів з 94 °C по 1 хв., 50 °C (45 °C) по 1 хв., 72 °C по 1 хв. (або 90 секунд) та термінального 1 циклу за 72 °C 10 хв. (або 15 хв.).

II.1 цикл 95 °C 1 хв., 40 циклів з 95 °C по 15 сек., 45 °C по 15 сек., 72 °C по 15 сек. та фінальної елонгації з 1 циклу за 72 °C 10 хв.

3.9.3. Електрофорез у гелі

Для електрофорезу продуктів ПЛР, застосовували застиглий 1 %-ний (або 0,8 %-ний) розчин агарозного гелю у 10× буфері ТАЕ з попередньо виготовленими лунками для зразків ДНК. Гель поміщали у 1× розчин буферу ТАЕ у електрофоретичній ванні.

Для здійснення електрофорезу у гелі, 2 (або 1) мкл продукту полімеразно-ланцюгової реакції змішували з 2 (або 1) мкл розчину барвника бромфенолового синього для візуалізації процесу проходження ДНК крізь гель) та готову суміш додавали до лунки в гелі. Окремо, до 2 мкл розчину барвника додавали 5 мкл розчину, що містить відрізки ДНК з відомою кількістю пар основ, що виконуватиме роль масштабу при інтерпретації результатів. Після завершення підготовки, на електрофоретичну камеру подавали електричну напругу у 120 В зі змінним струмом протягом 45 хвилин (або 20 хвилин, в залежності від розміру електрофоретичної ванни).

Після завершення електрофорезу гель виймали з буферного розчину та поміщали у розчин бромистого етидію (EtBr) на 10 хвилин. Після витримування у даному розчині, гель підсушували фільтрувальним папером та піддавали ультрафіолетовому опроміненню середнього рівня (довжина хвилі 290 нм). Зв'язаний з ДНК бромистий етидій яскраво флуоресціює у червоно-оранжевому спектрі, що дозволяє виявити наявність та місцезнаходження ДНК у гелі та контамінацію зразків сторонніми відрізками ДНК (наприклад, димерів праймерів). В залежності від місцезнаходження відносно масштабу, можна

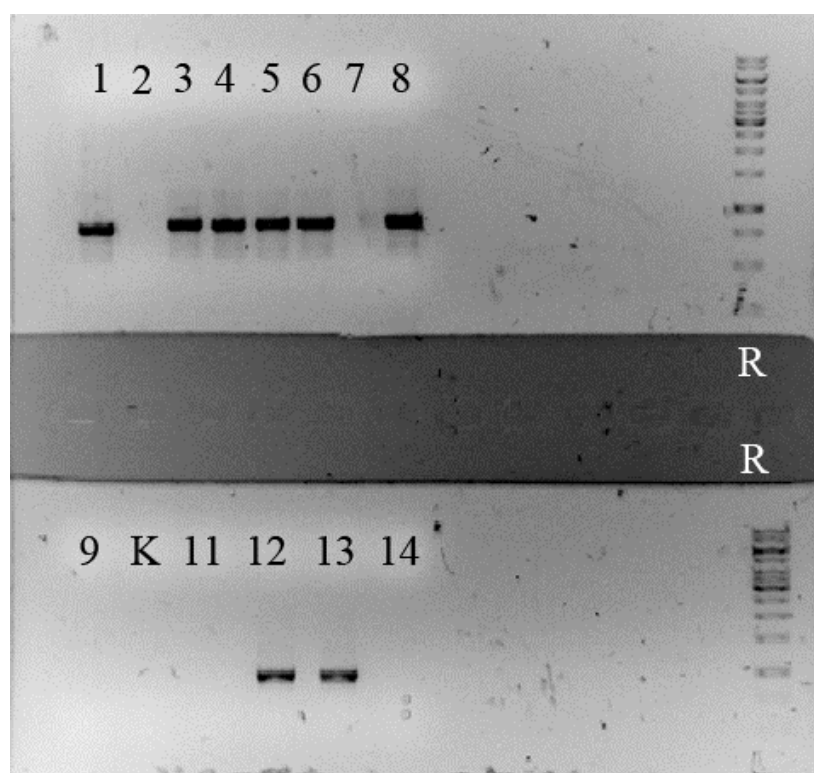


Рис. 3.2. Приклад візуалізації результату електрофорезу у 0,8 %-ному агарозному гелі (інверсія кольору). Номери: 1, 3-6, 8 – позитивні, зі значною кількістю ДНК-ампліфікату, довжиною між 1000 та 750 по; 2, 7, 9, 11, 14 – негативні; 12, 13 – позитивні, з середньою кількістю ДНК-ампліфікату, довжиною між 1000 та 750 по; Контроль (K) чистий. R – суміш послідовностей для масштабування. Ізоляти *Steinernema*: 1 – Kan, повторність III (п. III); 3 – Gol-7, п. III; 4 – Ask12, п. III; 5 – Ask6-2, t. 2, п. III; 6 – Ask6-2, п. III; 7 – Ask12, t. 2, п. III; 8 – Gol-2, п. III; 9 – Gol-3, п. III; 11 – Gol-7, п. I; 12 – Ask. 12, t. 2, п. I; 13 – Kan, п. II.; 14 – Dorylaimidae: 2 – Ask6-2, п. III; 14 – Ask6-2, п. II. (Оригінал).

визначити приблизну масу (кількість пар основ) ампліфікованих відрізків ДНК. Контроль має бути порожнім на зображенні. Інтенсивність флуоресценції може слугувати показником для визначення кількості ДНК у продукті ПЛР.

При наявності стійкої флуоресценції з відсутнім або низьким рівнем контамінації (олігонуклеотиди, або відрізки довжиною не більше 300 по), продукт ПЛР визначали як придатний до подальшого сіквенсування.

Очистку продуктів ПЛР проводили за допомогою стандартного набору для очистки продуктів ПЛР (High Pure PCR Product Purification Kit v.16, Roche) за стандартним протоколом: доводили продукти ПЛР бідистильованою водою до об'єму 100 мкл, додавали 500 мкл зв'язуючого буферу та перемішували на апараті Вортекс, після чого переносили суміш до фільтрувальної вставки мікропробірки для збирання та центрифугували 30 секунд при $11,6 \times 10^3$ об./хв.; відфільтровану рідину видаляли; до фільтрувальної вставки знову добавляли 500 мкл відмиваючого буферу та центрифугували 1 хвилину при $11,6 \times 10^3$ об./хв., після чого повторювали центрифугування протягом однієї хвилини з 200 мкл миючого буферу, рідину зі мікропробірки для збирання кожного разу видаляли; після центрифугування, фільтрувальну вставку переміщували до мікроцентрифужної пробірки на 1,5 мл та добавляли до неї елютуючий буфер та центрифугували одну хвилину при $11,6 \times 10^3$ об./хв., після центрифугування, фільтрувальну вставку видаляли. Очищену ДНК, що містилася у розчині в пробірці, зберігали при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ та використовували для подальших досліджень.

Концентрацію псДНК у елютованому розчині вимірювали за допомогою флюорометру Qubit® 2.0 (Invitrogen™) за стандартним протоколом: до 195 мкл попередньо підготованого робочого буферу (1 мкл Qubit™ dsDNA HS Reagent та 199 мкл Qubit™ dsDNA HS Buffer) додавали 5 мкл продукту ПЛР, ретельно перемішували та поміщали до робочої камери флюорометру. Придатною до подальшого сіквенсування вважається псДНК довжиною більше 500 по, масою 2-5 мкг, розчинена в ТЕ буфері до концентрації більше 20 нг/мкл.

Для сіквенсування зразків користувались послугами фірм Macrogen Inc. та SeqMe.

3.9.4. Обробка результатів сіквенсування. BLAST

Отримані після сіквенсування хроматограми обробляли вручну за допомогою програми Chromatogram Explorer v.3.3.0 на стандартних налаштуваннях «порогування» піків (2014a), потім для кожного ізоляту пряму та реверсну послідовності ДНК об'єднували та вручну виправляли за допомогою програми BioEdit (Hall, 1999). Виправлення та об'єднання послідовностей також виконували за допомогою програмного пакету DNA Baser v.4.16.0 (2014b). Вирівнення об'єднаних сіквенсів виконували за допомогою програми ClustalW (Thompson, Higgins та Gibson, 1994), шляхом повного множинного вирівнення.

Після проведених маніпуляцій, сіквенси ДНК обробляли за допомогою програмного онлайн-пакету BLAST з алгоритмом пошуку максимальної подібності Megablast (Morgulis *та ін.*, 2008). З обраних програмою з пошукової генетичної бази сіквенсів, обиралися ті, що мали вірогідну подібність з отриманими в результаті дослідження сіквенсами більше 95 %. Вірогідність визначали програмою у вигляді двох параметрів, – E та Максимального перекриття. Подібність досліджуваного сіквенсу та обраного програмою з бази даних вважали вірогідною при значеннях параметру E, близьких до нуля та Максимального перекриття – при максимальних значеннях серед вибірки, близьких до 100 %.

Для виявлення філогенетичних зв'язків використано програму MrBayes v.3.2.2 (Ronquist *та ін.*, 2011): еволюційну модель GTR, – генералізовану оборотно-часову (шість параметрів швидкості заміщення) та Markov chain Monte-Carlo з кількістю генерацій, необхідною для досягнення стандартного відхилення частотного спліту $\leq 0,01$. Філогенетичне дерево візуалізовано за допомогою програми TreeView (Page, 1996) при кількості генерацій з мінімальним рівнем стандартного відхилення.

Також, для вирівнювання сіквенсів та проведення філогенетичного аналізу використано програму MEGA версії 6 (Tamura *та ін.*, 2013). Методи побудови дерев та кількості генерації вказані у примітках до відповідних ілюстрацій.

РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

4.1. Виявлені ізоляти

Виявлено 13 проб з ознаками ураження тест-комах ентомопатогенними нематодами. З заражених тест-комах було виділено 13 ізолятів ЕПН, що складає 3 % від загальної кількості зібраних проб.

ЕПН виділено з Закарпатської, Київської, Черкаської, Херсонської, Запорізької областей та АР Крим.

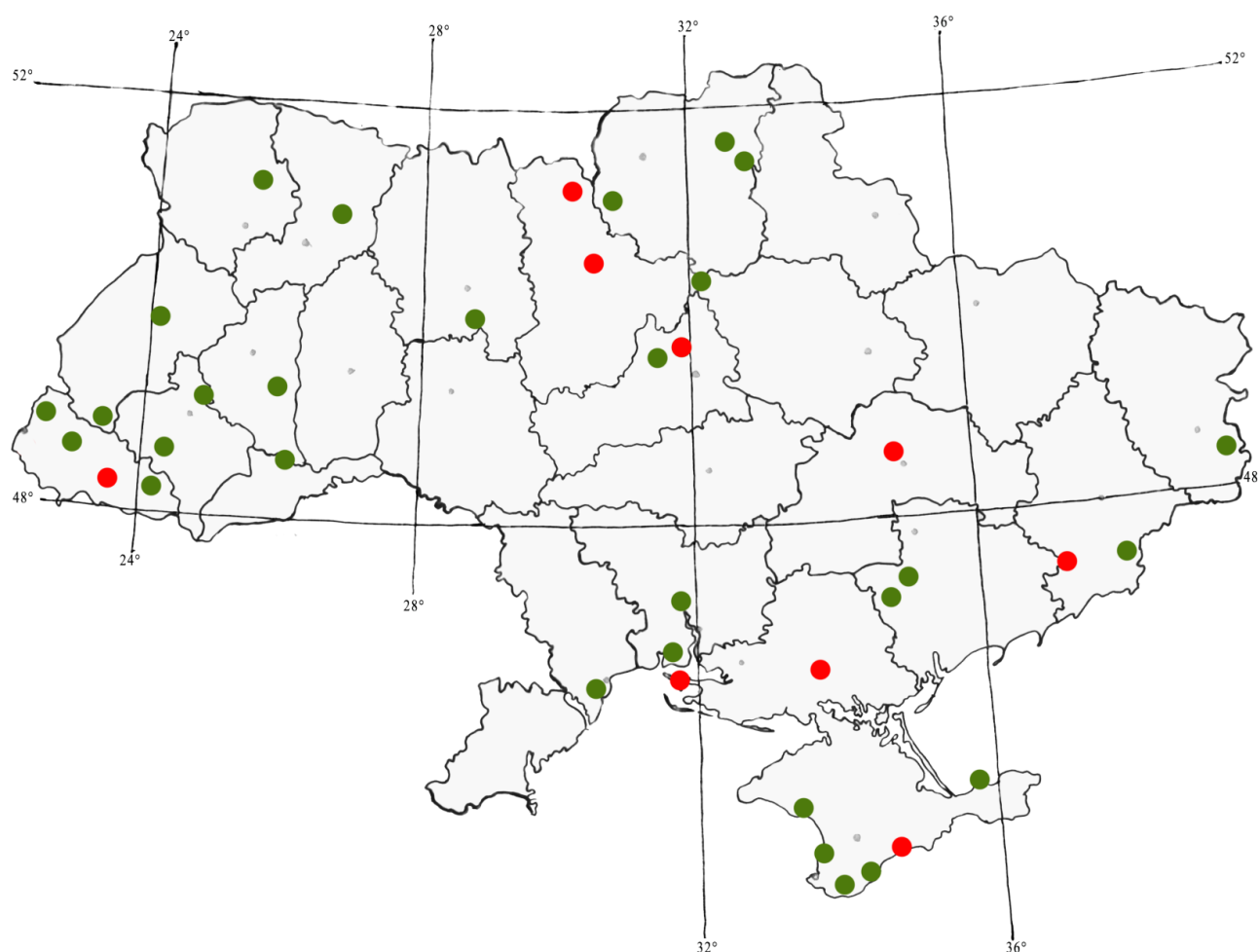


Рис. 4.1. Точки відбору проб ґрунту. Червоним кольором позначені точки з позитивними на ЕПН зразками, зеленим – без виявлення ЕПН. (Оригінал).

4.2. Ізоляти ентомопатогенних нематод, виділені у об'єктах природно-заповідного фонду України

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

Синоніми: *Neoaplectana arenaria* Artyukhovsky, 1967, *N. anomali* Kozodoi, 1984, *S. anomalae* (Kozodoi, 1984) Curran, 1989.

Ізолят СН подано за (Yakovlev *ma in.*, 2017), ізолят IR подано за (Yakovlev, Kharchenko та Mráček, 2014).

Поширення:

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

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

Субстрат: дерновий підзолистий ґрунт (СН); дерновий піщаний ґрунт (IR).

Домінанти рослинної асоціації в місці виявлення:

IR: *Festuceta beckeri* Stibick, *Artemisieta marschalliana* Spreng., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., *Bolboschaenus maritinus* (L.) Palla, *Puccinella gigantea* Grossh.

СН: *Quercus robur* L., *Pinus sylvestris* L., 1753

Кліматичні умови в місці виявлення (на день відбору проб) (Meteopost):

СН: температура повітря +17 °С та вологість повітря 98 %.

IR: температура повітря +38 °С та вологість повітря 24 %.

Описи:

***S. arenarium* ізолят IR (Рис. 4.2)**

Досліджено п'ять самців I генерації: довжина тіла в середньому становить 1353±120 (1232-1495); товщина – 90±13 (78-109); відстань від клоаки до кінця хвоста – 25±4 (22-31); відстань від апікального кінця до кардії – 199±8 (189-208); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 76±12 (62-84); відстань від

апикального кінця до нервового кільця – 151 ± 12 (140-164). Враховано наступні коефіцієнти: $D\% = 38 \pm 7$ (31-44); $GL = 49 \pm 2,1$ (47-51); $SL = 61 \pm 4$ (56-65); $GS\% = 79 \pm 5$ (75-89). Мукральний відросток на задньому кінці тіла відсутній.

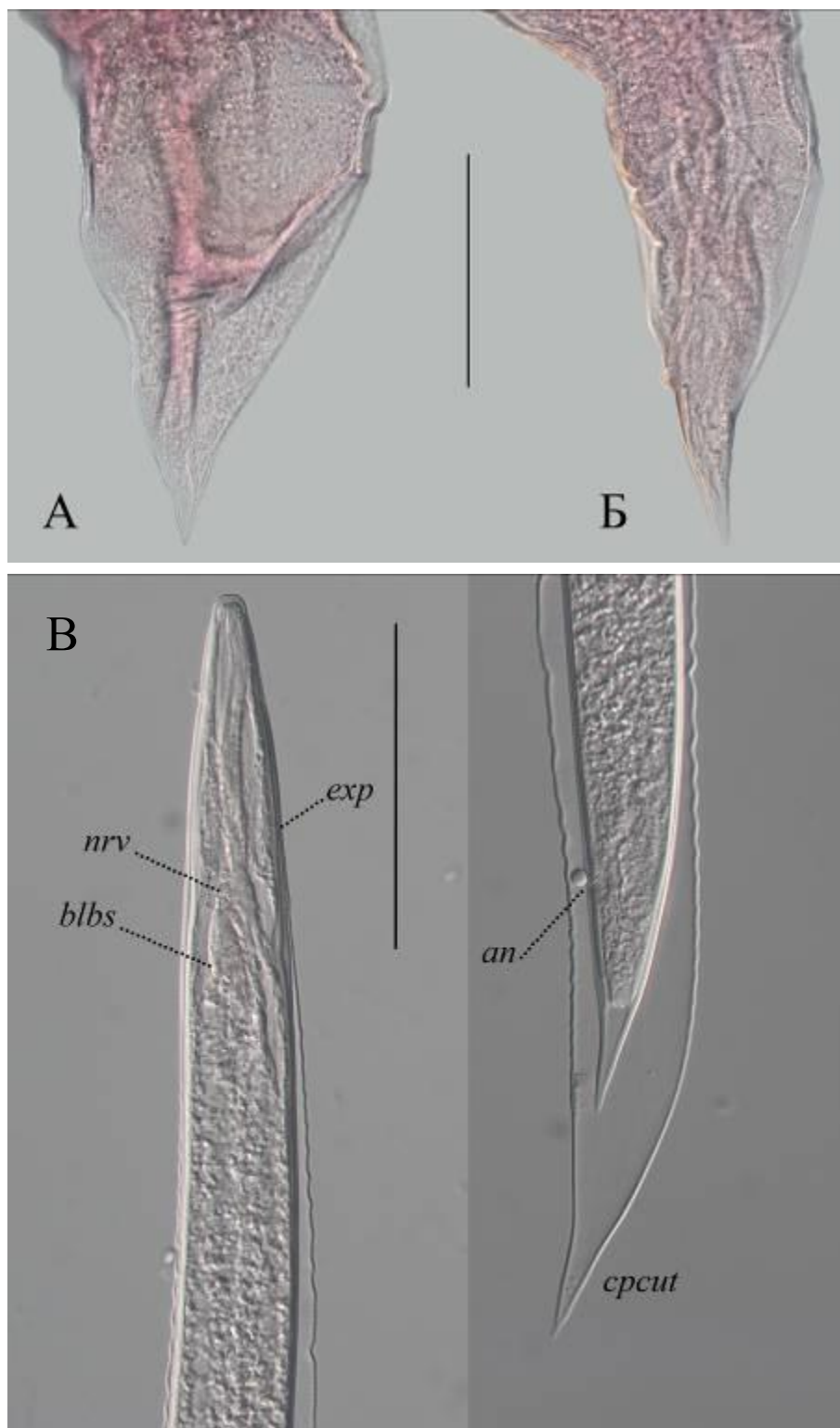


Рис. 4.2. *S. areparium* ізолят IR: А – каудальний відділ самиці I генерації; Б – каудальний відділ самиці II генерації; В – інвазійна личинка. Масштаб 100 мкм. Оригінал.

Досліджено 25 інвазійні личинок: довжина тіла становить 924 ± 41 (851-986); товщина – 40 ± 8 (28-54); відстань від анусу до кінця хвоста – 76 ± 5 (62-84); відстань від апікального кінця до кардії – 131 ± 9 (115-147); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 76 ± 3 (71-82); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 98 ± 5 (85-101); довжина гіалінового кінця – 34 ± 1 (33-35). Вираховано наступні коефіцієнти: $D\% = 59 \pm 4$ (52-69); $E\% = 102 \pm 9$ (90-130); $a = 24 \pm 5$ (18-35); $b = 7 \pm 1$ (6-8); $c = 12 \pm 1$ (11-16).

***S. arenarium* ізолят СН**

Морфометричні параметри наведені в таблиці Таблиці 4.1. Загалом, морфологічні характеристики нематод з ізоляту СН знаходяться у межах раніше описаних для даного виду, окрім того, що: дорослі особини мають менші розміри; самці мають менші показники коефіцієнту $GS\%$; у самців другого покоління на хвості присутній напів-прозорий мукральний відросток.

Також, виявлено, що самиці першого покоління приймають L- або C-подібне положення тіла при гарячій фіксації, у їх вульві присутня добре помітна епіптігма, а на хвостовому кінці знаходиться постанальне розширення, кінець хвоста з трьома-чотирма папіллоподібними структурами. Натомість, самиці другого покоління приймають I-подібне положення тіла при гарячій фіксації, поза вульвою знаходиться добре помітне пост-вульварне розширення, а хвостовий кінець – конічний, пальцеподібний з добре розвиненим постанальним розширенням.

Таблиця 4.1.

Морфометричні параметри нематод культури ЕПН *S. arenarium* ізоляту СН

Параметр	♂I	♀I	♂II	♀II	IJ
n	20	10	20	10	20
L	1092 ± 86 (957-1238)	2911 ± 189 (2653-3297)	1276 ± 130 (1114-1564)	2116 ± 193 (1931-2564)	1010 ± 61 (894-1099)
W	71 ± 6 (55-80)	172 ± 7 (165-185)	79 ± 6 (72-98)	115 ± 9 (105-138)	34 ± 3 (28-40)

Параметр	♂I	♀I	♂II	♀II	IJ
NR	107±9 (93-120)	126±8 (113-135)	137±11 (105-153)	162±10 (140-175)	106±10 (83-123)
ES	135±13 (113-153)	184±11 (160-195)	169±10 (140-183)	203±11 (190-220)	138±13 (110-173)
T	29±3 (25-35)	47±7 (35-60)	33±3 (28-40)	62±5 (55-73)	69±4 (63-75)
ABD (♀,J2d); CBD (♂)	42±3 (35-48)	66±8 (50-80)	41±3 (34-45)	42±3 (38-48)	23±2 (19-28)
SL	65±4 (58-73)	-	71±4 (63-78)	-	-
GL	44±7 (30-58)	-	47±3 (43-53)	-	-
SW %	154±14 (125-179)	-	178±20 (144-226)	-	-
GS %	68±9 (52-85)	-	66±4 (57-76)	-	-
V	-	1564±104 (1436-1752)	-	1153±128 (1059-1406)	-
V %	-	54±1 (51-55)	-	56±2 (54-61)	-
Hya	-	-	-	-	27±3 (20-35)
H %	-	-	-	-	39±5 (31-48)
D %	69±6 (59-82)	80±4 (72-86)	77±5 (67-88)	75±5 (67-84)	62±6 (49-75)
E %	323±43 (236-420)	314±39 (258-386)	392±41 (314-458)	247±9 (233-264)	123±8 (113-140)

Параметр	♂I	♀I	♂II	♀II	IJ
a	15±1 (13-18)	17±1 (16-18)	16±1 (14-19)	19±2 (14-23)	30±3 (23-35)
b	8±1 (7-9)	16±1 (14-18)	8±1 (7-11)	10±1 (9-12)	7±1 (6-10)
c	38±4 (31-47)	63±10 (48-81)	39±4 (31-45)	34±2 (31-37)	15±1 (13-17)

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

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

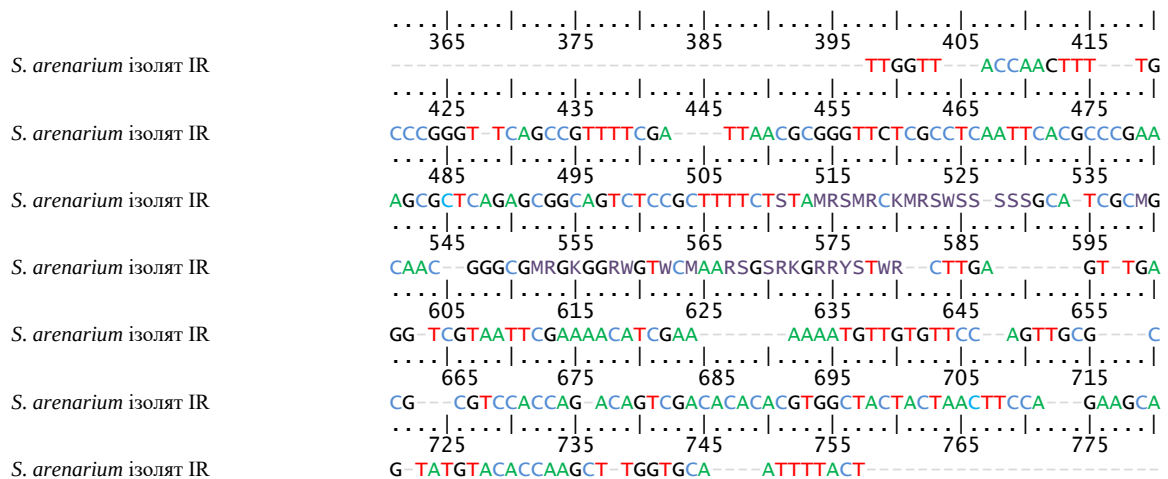


Рис. 4.3. Особливості об'єднаного секвенсу ділянки 18S; ITS1-5.8S-ITS2; 28S нематод виду *S. arenarium* ізоляту IR.

В обох ізолятах було виявлено генний поліморфізм по сіквенсованій ділянці ITS1-5.8S-ITS2 (Рис. 4.3). Так, в ізоляті СН різниця між клонами відрізка складала 1-9 по (~1 % здв).

На основі отриманих сіквенсів було проведено аналіз філогенетичних відносин між ізолятами даного виду з ізолятами, виділеними з території Європи,

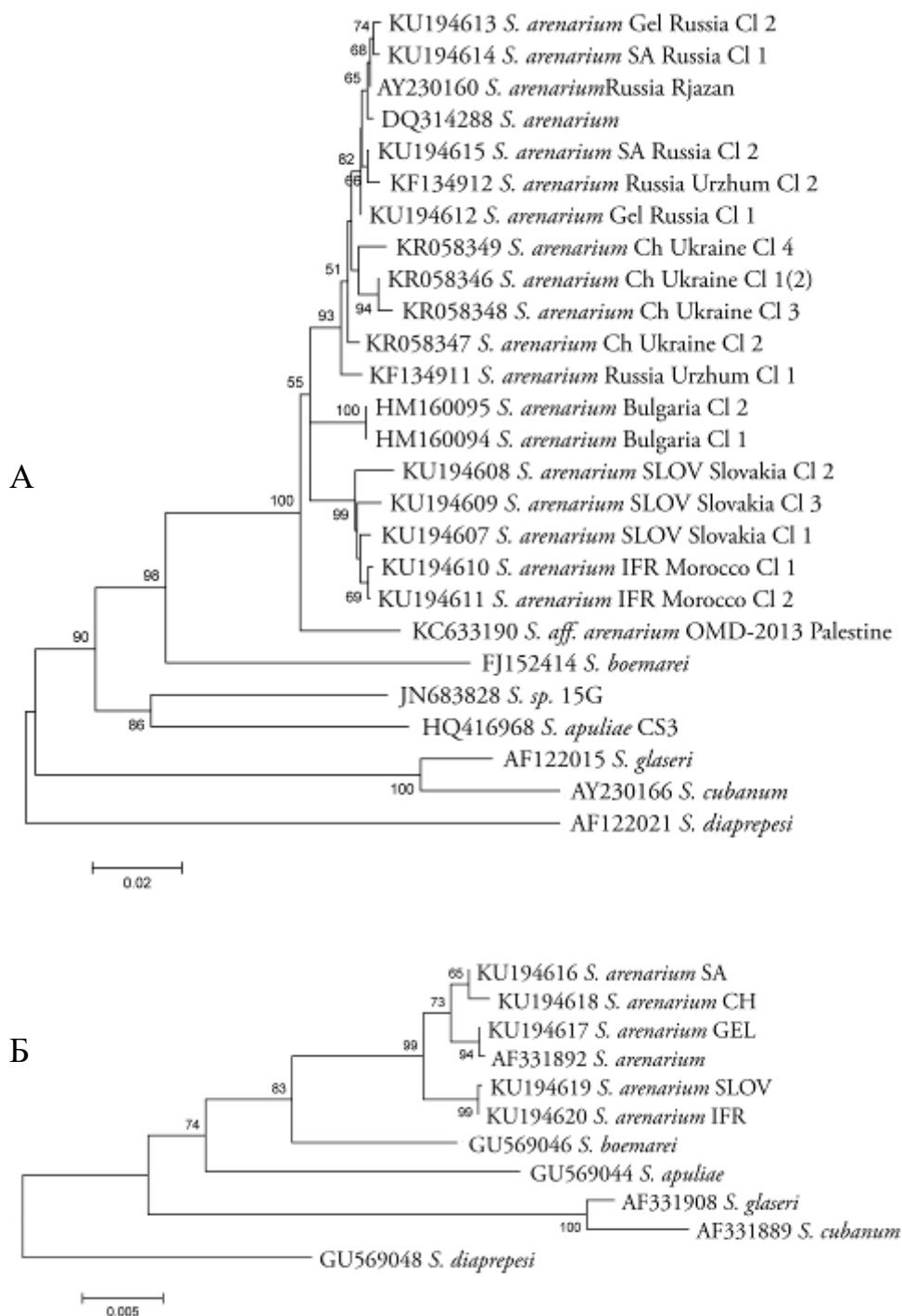


Рис. 4.4. Філогенетичні відносини між ізолятами *S. arenarium* на основі аналізу сіквенсів ділянки ITS1-5.8S-ITS2 рДНК (А) та ділянка D2-D3 28S рДНК (Б). В якості зовнішньої групи використано сіквенси відповідної ділянки ізолятів видів *S. apuliae*, *S. boemarei*, *S. cubanum*, *S. diaprepesi* та *S. glaseri*. Кількість генерацій 10000.

Марокко та Палестини (див. Рис. 4.4), в Таблицях 4.2-4.3 наведено індекси ідентичності сіквенсів. 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 групи, з двома вираженими кладами (Рис. 4.4 А, Б): Україна та Росія; Словаччина та Марокко. На дереві ITS1-5.8S-ITS2 (Рис. 4.4 А) присутня третя кладка, 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). Низька частота зустрічей вказує на недоліки методики.

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

Таблиця 4.2.

Індекси парної подібності для ізолятів виду *S. arenarium* та зовнішньої групи для відрізка D2-D3 28S рДНК.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 KU194618 <i>S. arenarium</i> Ch	Ід	0	3	6	5	5	19	29
2 KU194616 <i>S. arenarium</i> SA	100.0	Ід	1	5	5	1	19	29
3 KU194617 <i>S. arenarium</i> GEL	99.6	99.9	Ід	6	6	0	19	29
4 KU194619 <i>S. arenarium</i> SLOV	99.3	99.4	99.3	Ід	0	7	18	28
5 KU194620 <i>S. arenarium</i> IFR	99.4	99.4	99.3	100.0	Ід	6	18	28
6 AF331892 <i>S. arenarium</i>	99.4	99.9	100.0	99.2	99.3	Ід	19	29
7 GU569046 <i>S. boemarei</i>	97.7	97.7	97.7	97.8	97.8	97.7	Ід	27
8 GU569044 <i>S. apuliae</i>	96.5	96.5	96.5	96.6	96.6	96.5	96.7	Ід

Примітки: нижче діагоналі – процентне співвідношення подібності, вище діагоналі – загальна кількість відмінних нуклеотидів; Ід – ідентичні; червоним кольором виділено результати в діапазоні 99,9-100,0 %, жовто-гарячим – 99,5-99,8 %, жовтим – 99,0-99,4 %, зеленим – зовнішню групу.

Таблиця 4.3.

Індекси парної подібності для ізолятів виду *S. arenarium* та зовнішньої групи для відрізка ITS1-5.8S-ITS2 рДНК.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	KR058346 <i>S. arenarium</i> Ch Ukraine Cl 1	Ід	8	1	7	7	7	4	7	20	24	23	19	20	10	7	15	15	5	6	23	74
2	KR058347 <i>S. arenarium</i> Ch Ukraine Cl 2	98.9	Ід	9	7	7	5	4	7	23	27	22	22	21	6	7	14	14	5	6	23	71
3	KR058348 <i>S. arenarium</i> Ch Ukraine Cl 3	99.9	98.8	Ід	8	11	11	8	14	24	28	27	23	24	13	12	18	18	9	10	28	79
4	KR058349 <i>S. arenarium</i> Ch Ukraine Cl 4	99.0	98.9	98.8	Ід	9	7	6	12	25	29	24	24	23	10	10	16	16	7	8	26	69
5	KU194614 <i>S. arenarium</i> SA Russia Cl 1	99.0	99.0	98.5	98.7	Ід	4	3	2	23	27	24	24	23	10	6	16	16	1	3	27	78
6	KU194615 <i>S. arenarium</i> SA Russia Cl 2	99.0	99.3	98.5	99.0	99.5	Ід	1	4	24	28	25	23	22	8	2	20	20	2	3	29	78
7	KU194612 <i>S. arenarium</i> Gel Russia Cl 1	99.5	99.5	98.9	99.1	99.6	99.9	Ід	3	22	26	23	21	20	7	3	16	16	1	2	26	76
8	KU194613 <i>S. arenarium</i> Gel Russia Cl 2	99.0	99.0	98.1	98.2	99.7	99.5	99.6	Ід	23	27	24	24	23	10	6	17	17	1	3	28	82
9	KU194607 <i>S. arenarium</i> SLOV Slovakia Cl 1	97.2	96.8	96.8	96.2	96.9	96.7	97.0	96.9	Ід	8	8	4	5	22	23	18	19	22	24	24	75
10	KU194608 <i>S. arenarium</i> SLOV Slovakia Cl 2	96.7	96.3	96.3	95.6	96.4	96.2	96.5	96.4	98.9	Ід	12	10	11	26	27	20	21	26	28	29	79
11	KU194609 <i>S. arenarium</i> SLOV Slovakia Cl 3	96.8	97.0	96.4	96.4	96.8	96.6	96.9	96.8	98.9	98.4	Ід	6	5	21	24	18	19	23	25	25	77
12	KU194610 <i>S. arenarium</i> IFR Morocco Cl 1	97.4	97.0	96.9	96.4	96.8	96.9	97.2	96.8	99.5	98.7	99.2	Ід	1	21	22	18	19	22	23	26	78
13	KU194611 <i>S. arenarium</i> IFR Morocco Cl 2	97.3	97.1	96.8	96.5	96.9	97.0	97.3	96.9	99.3	98.5	99.3	99.9	Ід	20	21	17	18	21	22	24	78
14	KF134911 <i>S. arenarium</i> Russia Urzhum Cl 1	98.6	99.2	98.3	98.5	98.7	98.9	99.1	98.7	97.0	96.5	97.2	97.2	97.3	Ід	8	15	15	8	9	24	73
15	KF134912 <i>S. arenarium</i> Russia Urzhum Cl 2	99.0	99.0	98.4	98.5	99.2	99.7	99.6	99.2	96.9	96.4	96.8	97.1	97.2	98.9	Ід	17	17	4	5	28	78
16	HM160094 <i>S. arenarium</i> Bulgaria Cl 1	97.9	98.0	97.6	97.6	97.8	97.2	97.8	97.7	97.5	97.3	97.6	97.6	97.7	98.0	97.7	Ід	0	15	17	22	69
17	HM160095 <i>S. arenarium</i> Bulgaria Cl 2	97.9	98.0	97.6	97.6	97.8	97.2	97.8	97.7	97.4	97.1	97.4	97.4	97.6	98.0	97.7	100	Ід	15	17	23	69
18	AY230160 <i>S. arenarium</i> Russia Rjazan	99.3	99.3	98.8	98.9	99.9	99.7	99.9	99.9	97.0	96.5	96.9	97.1	97.2	98.9	99.5	97.9	97.9	Ід	1	26	76
19	DQ314288 <i>S. arenarium</i>	99.2	99.2	98.7	98.8	99.6	99.6	99.7	99.6	96.8	96.2	96.7	96.9	97.1	98.8	99.3	97.7	97.7	99.9	Ід	28	78
20	KC633190 <i>S. aff. arenarium</i> OMD-2013 Palestine	96.8	96.8	96.3	96.1	96.3	96.0	96.5	96.2	96.7	96.1	96.6	96.5	96.8	96.7	96.2	97.0	96.9	96.5	96.2	Ід	76
21	FJ152414 <i>S. boemarei</i>	89.4	89.8	89.1	89.3	89.2	89.0	89.4	88.7	89.6	89.1	89.3	89.2	89.2	89.8	89.2	90.3	90.3	89.4	89.2	89.4	Ід

Примітки: нижче діагоналі – процентне співвідношення подібності, вище діагоналі – загальна кількість відмінних нуклеотидів; Ід – ідентичні; червоним кольором виділено результати в діапазоні 99,0-100,0 %, жовто-гарячим – 98,0-98,9 %, жовтим – 95,0-97,9 %, зеленим – зовнішню групу.

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

Синоніми: *Neoplectana feltiae* Filipjev, 1934, *N. bibionis* Bovien, 1937, *S. bibionis* (Bovien, 1937) Wouts *ma in.*, 1982, *N. leucaniae* Hoy, 1954, *S. leucaniae* (Hoy, 1954) Wouts *ma in.*, 1982.

Ізоляти DONR, KM, Kar-4, Kar-13 подано за (Yakovlev, Kharchenko та Mráček, 2014).

Поширення: Виявлені в Дніпровсько-Орільському Природному заповіднику (ізолят DONR), координати знахідки 48.510521N, 34.806957E; філії «Кам'яні могили» Українського Степового Природного заповідника (ізолят KM), 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).

Субстрат: дерновий підзолистий ґрунт (DONR, Gol-2, Gol-3, Gol-7); бурий гірсько-лісовий ґрунт (Kar-4, Kar-13); звичайний чорнозем (KM); темно-каштановий ґрунт (Ask-6-2, Ask-12); підстилка (Kan).

Домінанти рослинної асоціації в місці виявлення:

Ask-6-2, Ask-12 (Веденьков та Водоп'янова, 1974): родини Compositae (14,5 %), Graminae (9,9 %), Cruciferae (6,6 %), Labiatae (5,4 %), Leguminosae (7,0 %).

DONR: *Quercus robur* L., *Ulmus laevis* Pall., *Acer campestre* L., *A. tataricum* L., *A. platanooides* L., *Sambucus nigra* L., *Chelidonium major* L., *Urtica dioica* L., *Viola odorata* L., *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.

Gol-2: *Quercus robur*, *Carpinus betulus* L.

Gol-3, Gol-7: *Quercus robur*, *Malus* sp.

КМ (Лисенко, 2008): проби були відібрані в не характерному для степу *Rosa sp.* – *Elytrigia* Desv., *Melica transsilvanica* Schur., *Poeta angustifoliae*, *Stipa capillata* L., *Centaurea diffusa* Lam., *Achillea millefolium* L., *Artemisia vulgaris* L., *Scabiosa* L., *Cephalaria uralensis* (Murray) Roem., Schult., *Verbascum* L., *Echium vulgare* L., *Stipa pennata* L. = *S. joannis* Celak.

Kan: *Carpinus betulus*, *Quercus robur*, *Betula pendula* Roth.

Kar-4, Kar-13: *Quercus pubescens* Willd., *Crataegus* L., *Cotinus coggigria* Scop., *Paliurus spina-christi* Mill., *Jasminum fruticans* L., *Asphodeline taurica* (Pall.) Endl., *Artemisia* L., *Elytrigia* Desv.

Кліматичні умови в місці виявлення: температура повітря та вологість повітря на день відбору проби складали: DONR: +38 °C, 18 %; КМ: +39 °C, 15 %; Kar: +30 °C, 36 %; Kan: +18 °C, 38 %; Ask: +25 °C, 41 %; Gol: +25 °C, 54 %.

Описи. Описи морфології та морфометрія представлена окремими підрозділами, оскільки ізоляти виду мають індивідуальні особливості, представлені у текстовій формі. Результати промірів вказано у мікрометрах.

***S. feltiae* ізолят Ask-6-2**

Досліджені десять особин *самців I генерації*: довжина тіла в середньому становить 912 ± 63 (816-1054); товщина – 75 ± 6 (66-86); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 107 ± 5 (143-164); мукральний відросток присутній. Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів такими показниками та коефіцієнтами: відстань від клоаки до кінця хвоста – 34 ± 3 (29-36); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 152 ± 7 (143-164); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 91 ± 5 (81-96); довжина губернакулуму – 49 ± 3 (44-52); довжина спікул – 63 ± 5 (52-68); діаметр тіла на рівні клоаки – 39 ± 4 (34-47); $D\% = 60 \pm 3$ (55-65); $GS\% = 77 \pm 9$ (65-95); $SW\% = 163 \pm 19$ (133-200).

Досліджені десять особин *самиць I генерації*: довжина тіла становить 3148 ± 348 (2690-3870); товщина – 92 ± 9 (78-103); відстань від анусу до кінця хвоста – 48 ± 8 (41-62); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 166 ± 9 (152-180); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 85 ± 5 (78-90); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 116 ± 8 (103-127);

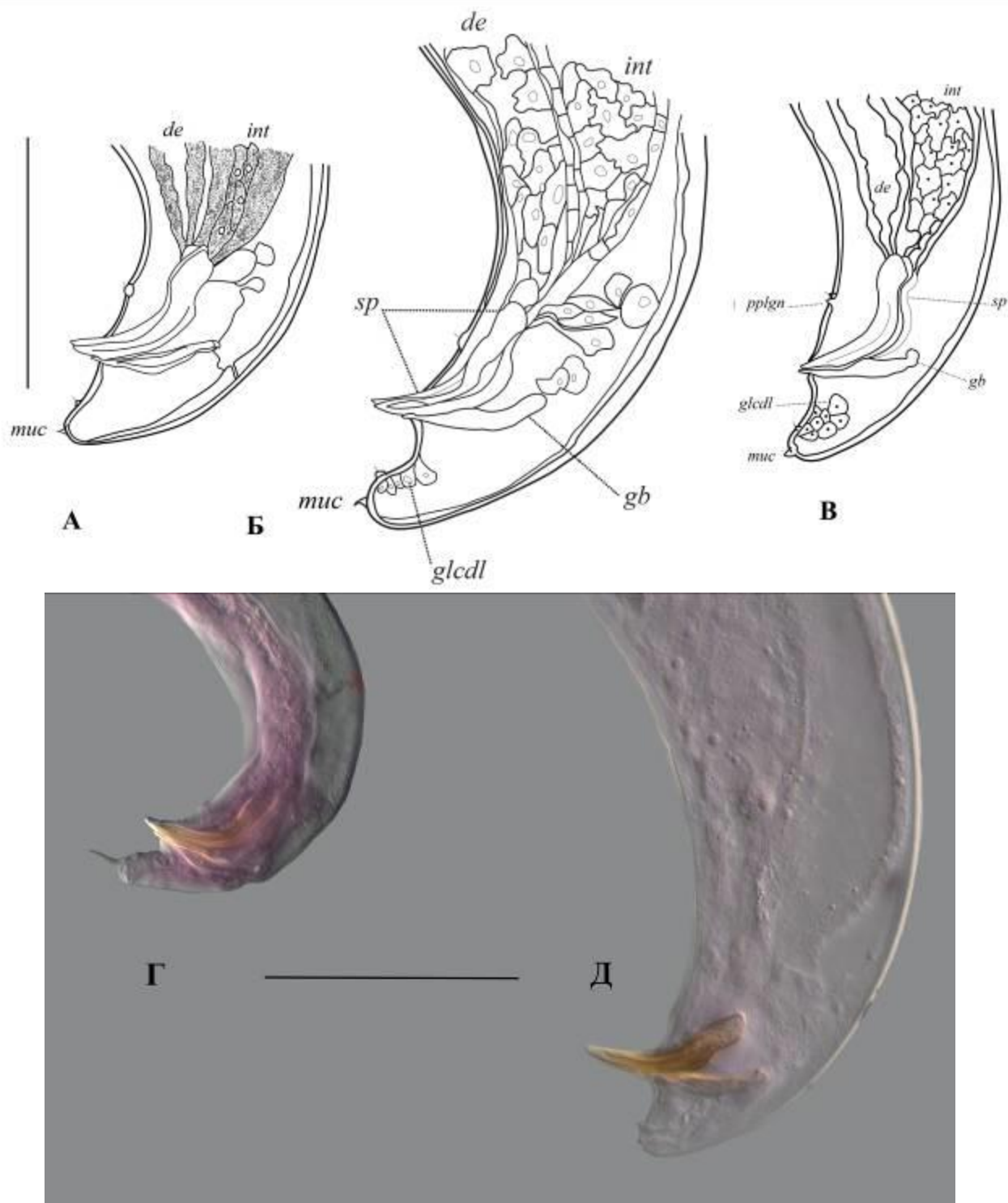


Рис. 4.5. Хвостові кінці самців I генерації *Steinernema feltiae*, ізоляти: А – Ask-12; Б – Gol-2; В – Gol-7; Г – DONR; Д – КМ. Масштаб 100 мкм. Оригінал.

відстань від апікального кінця до вульви – 1651 ± 152 (1520-1910); діаметр тіла на рівні анусу – 66 ± 14 (45-86). Вирахувано наступні коефіцієнти: $D \% = 51 \pm 3$ (49-55); $V \% = 53 \pm 2$ (49-57). Виявлено, що епіптігма у вульві виступаюча, помітні вульварні потовщення.

***S. feltiae* ізолят Ask-12 (Рис. 4.5)**

Досліджені десять особин *самців I генерації*: довжина тіла в середньому – 1114 ± 96 (927-1287); діаметр – 100 ± 12 (80-115); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 79 ± 6 (70-90). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів такими показниками та коефіцієнтами: відстань від клоаки до кінця хвоста – 32 ± 4 (23-38); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 134 ± 5 (128-143); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 86 ± 6 (73-95); довжина губернакулуму – 53 ± 2 (50-55); довжина спікул – 63 ± 3 (58-65); діаметр тіла на рівні клоаки – 41 ± 4 (35-48); $D\% = 64 \pm 4$ (57-68); $GS\% = 85 \pm 5$ (77-96); $SW\% = 154 \pm 15$ (132-186). Мукральний шип на хвостовому кінці присутній, проте короткий.

Досліджені три *самиці I генерації*: довжина тіла в середньому становить 4146 ± 441 (3744-4617); товщина – 197 ± 20 (175-215); відстань від анусу до кінця хвоста – 43 ± 11 (33-55); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 170 ± 7 (163-175); відстань від верхів'я апікального кінця до екскреторної пори – 87 ± 24 (63-110); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 108 ± 6 (105-115); відстань від апікального кінця до вульви – 2091 ± 258 (1872-2376); діаметр тіла на рівні анусу – 80 ± 3 (78-83); Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами $D\% = 51 \pm 14$ (36-64) та $V\% = 50 \pm 1$ (50-51).

***S. feltiae* ізолят DONR (Рис. 4.5)**

Досліджені вісім особин *самців II генерації*: довжина тіла становить 855 ± 44 (812-935); діаметр – 55 ± 7 (50-68); відстань від клоаки до кінця хвоста – 25 ± 3 (22-31); довжина стравоходу – 126 ± 5 (118-132); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 60 ± 13 (43-76); довжина губернакулуму – 42 ± 1 (40-43); довжина спікул – 63 ± 2 (61-67). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами $D\% = 47 \pm 9$ (35-59) та $GS\% = 67 \pm 4$ (60-72). Мукральний шип на хвостовому кінці короткий.

Досліджено 25 *інвазійних личинок*: довжина тіла – 707 ± 39 (627-790); товщина тіла – 30 ± 2 (26-34); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 53 ± 4 (47-61); довжина стравоходу – 113 ± 9 (101-130); відстань від верхів'я

апикального кінця до нервового кільця – 91 ± 7 (76–109); відстань від анусу до кінця хвоста – 78 ± 4 (71–87); довжина гіалінового кінця – 37 ± 1 (35–38). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами: $a = 24 \pm 2$ (19–27); $b = 6 \pm 1$ (5–7); $c = 9 \pm 1$ (8–10); $D\% = 47 \pm 4$ (39–54); $E\% = 68 \pm 6$ (59–83).

***S. feltiae* ізолят Gol-2 (Рис. 4.5)**

Досліджені десять *самців I генерації*: довжина тіла становить 1311 ± 75 (1206–1422); товщина – 111 ± 12 (95–138); відстань від клоаки до кінця хвоста – 35 ± 3 (30–40); довжина стравоходу – 149 ± 8 (133–160); довжина губернакулуму – 51 ± 2 (48–53); довжина спікул – 67 ± 6 (60–78); діаметр тіла на рівні клоаки – 45 ± 4 (38–50). Вирахувано коефіцієнти: $D\% = 48 \pm 6$ (40–63); $GS\% = 76 \pm 7$ (65–88); $SW\% = 152 \pm 12$ (133–168). Особини ізоляту не відрізняються від особин інших ізолятів лише такими показниками: відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 71 ± 7 (60–88) та відстань від апікального кінця до нервового кільця – 89 ± 4 (80–93). Мукральний шип на хвостовому кінці короткий та широкий.

Досліджені вісім *самців II генерації*: довжина тіла становить 708 ± 58 (624–782); діаметр – 51 ± 4 (48–58); відстань від клоаки до кінця хвоста – 28 ± 2 (25–30); довжина стравоходу – 122 ± 12 (110–148); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 49 ± 5 (40–55); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 79 ± 6 (73–93); довжина губернакулуму – 28 ± 2 (25–30); довжина спікул – 39 ± 3 (35–43); товщина тіла на рівні клоаки – 28 ± 3 (25–31). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами: $D\% = 40 \pm 6$ (33–50); $GS\% = 72 \pm 5$ (65–80); $SW\% = 145 \pm 19$ (120–170). Мукральний шип довгий, біля 15 мкм та тонкий.

Досліджені десять *самиць I генерації*: довжина тіла становить 3623 ± 865 (2862–6021); діаметр – 147 ± 21 (130–200); діаметр тіла на рівні анусу – 51 ± 10 (38–65); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 179 ± 15 (155–208); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 79 ± 12 (63–98); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 108 ± 12 (85–125); відстань від апікального кінця до вульви – 1891 ± 438 (1476–3087); діаметр тіла на рівні анусу –

62±8 (55-85). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів такими коефіцієнтами: $D\% = 44 \pm 7$ (35-52) та $V\% = 52 \pm 2$ (49-56).

Досліджені дві *самиці II генерації*: довжина тіла становить 1426±224 (1267-1584); діаметр – 129±12 (120-138); діаметр тіла на рівні анусу – 40±4 (38-43); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 141±19 (128-155); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 58±21 (43-73); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 90±14 (80-100); відстань від апікального кінця до вульви – 882; діаметр тіла на рівні анусу – 43±4 (40-45). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів такими коефіцієнтами: $D\% = 40 \pm 10$ (33-47) та $V\% = 56$.

***S. feltiae* ізолят Gol-3 (Рис. 4.6)**

Досліджені десять *самців I генерації*: довжина тіла становить 832±97 (713-980); товщина – 107±16 (78-130); відстань від клоаки до кінця хвоста – 30±9 (20-48); довжина стравоходу – 137±16 (113-170); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 54±15 (35-73); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 93±9 (78-108); довжина убернакулуму – 48±5 (43-55); довжина спікул – 65±5 (60-78); діаметр тіла на рівні клоаки – 41±4 (35-48); Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів такими коефіцієнтами: $D\% = 39 \pm 9$ (29-50); $GS\% = 74 \pm 6$ (65-85); $SW\% = 160 \pm 13$ (137-179). Мукральний шип на хвостовому кінці короткий (менше 5 мкм).

Досліджені дев'ять *самиць I генерації*: довжина тіла – 2624±506 (2119-3574); товщина – 177±19 (158-208); відстань від анусу до кінця хвоста – 46±12 (25-60); довжина стравоходу – 172±15 (150-188); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 59±17 (33-80); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 112±9 (100-125); відстань від апікального кінця до вульви – 1389±234 (1099-1082); діаметр тіла на рівні анусу – 73±12 (25-60). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів такими коефіцієнтами: $D\% = 34 \pm 10$ (22-53) та $V\% = 53 \pm 3$ (49-58). Епіптігма у вульві відсутня або не помітна.

Досліджені десять *інвазійних личинок*: довжина тіла становить 742±39 (675-790); діаметр – 27±1 (25-29); відстань від анусу до кінця хвоста – 73±6 (60-80);

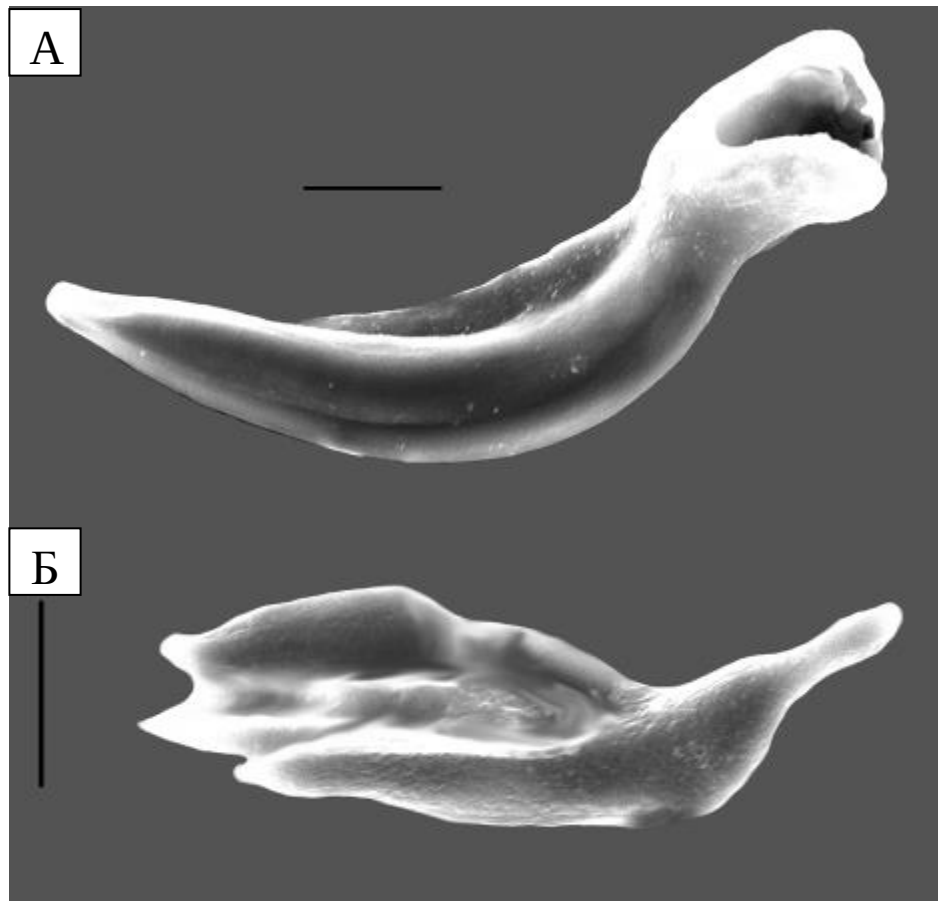


Рис. 4.6. Морфологічні особливості виду *S. feltiae*: спікули ізоляту Gol-3 (А) та рульок ізоляту Кап (Б) (оригінальне фото). Масштаб 10 мкм.

відстань від апікального кінця до кінця стравоходу — 124 ± 5 (118-135); відстань від апікального кінця до екскреторної пори — 57 ± 3 (53-63); відстань від апікального кінця до нервового кільця — 77 ± 10 (63-93); довжина гіалінового кінця — 30 ± 3 (25-35). Вираховано коефіцієнти: $D\% = 46 \pm 2$ (42-49); $E\% = 78 \pm 8$ (72-100); $a = 28 \pm 2$ (23-32); $b = 6 \pm 0$ (6); $c = 10 \pm 1$ (9-13); $H\% = 41 \pm 5$ (36-50).

***S. feltiae* ізолят Gol-7 (Рис. 4.5)**

Досліджені десять *самців I генерації*: довжина тіла становить 1017 ± 65 (950-1178); діаметр — 102 ± 13 (85-128); відстань від клоаки до кінця хвоста — 30 ± 4 (25-38); довжина стравоходу — 132 ± 9 (118-143); відстань від апікального кінця до екскреторної пори — 84 ± 6 (75-98); відстань від апікального кінця до нервового кільця — 83 ± 6 (73-95); довжина губернакулуму — 45 ± 2 (40-48); довжина спікул — 67 ± 4 (63-73); діаметр тіла на рівні клоаки — 41 ± 7 (33-55). Особини ізоляту відмінні

від особин інших ізолятів такими коефіцієнтами: $D\% = 64 \pm 5$ (56-70); $GS\% = 67 \pm 5$ (57-72); $SW\% = 166 \pm 29$ (127-215). Мукральний шип довгий, біля 10 мкм.

Досліджені десять *самців II генерації*: довжина тіла – 833 ± 80 (713-960); товщина – 63 ± 4 (58-73); відстань від клоаки до кінця хвоста – 26 ± 3 (20-30); довжина стравоходу – 107 ± 9 (93-125); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 67 ± 6 (60-78); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 72 ± 6 (63-83); довжина губернакулуму – 33 ± 3 (30-40); довжина спікул – 47 ± 3 (43-55); товщина тіла на рівні клоаки – 35 ± 2 (30-38). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів такими коефіцієнтами: **$D\% = 63 \pm 5$ (56-73); $GS\% = 71 \pm 4$ (63-78); $SW\% = 134 \pm 14$ (113-158)**. Мукральний шип довгий, біля 8 мкм.

Досліджені дев'ять *самиць I генерації*: довжина тіла становить 2475 ± 471 (1940-3445); діаметр – 153 ± 33 (129-238); довжина хвоста – 27 ± 10 (13-45); відстань від верхів'я апікального кінця до кінця стравоходу – 154 ± 24 (125-200); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 65 ± 10 (50-83); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 102 ± 19 (75-140); відстань від апікального кінця до вульви – 1305 ± 269 (1069-1950); діаметр тіла на рівні анусу – 52 ± 10 (38-65). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів за коефіцієнтами: $D\% = 43 \pm 6$ (35-53); $V\% = 53 \pm 4$ (45-58). Виявлено, що вульва закрита, зі скритою епіптігмою, дистальна губа вульви більша за проксимальну в 2 рази. На хвості присутній короткий мукральний шип.

Досліджені сім *самиць II генерації*: довжина тіла становить 1151 ± 147 (990-1346); товщина – 81 ± 12 (68-98); довжина хвоста – 44 ± 5 (38-50); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 128 ± 8 (113-140); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 106 ± 8 (95-118); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 80 ± 10 (60-88); відстань від апікального кінця до вульви – 635 ± 83 (545-752); діаметр тіла на рівні анусу – 36 ± 1 (35-38). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами: $D\% = 83 \pm 5$ (73-88) та $V\% = 55$ (55-56). Губи вульви не виступаючі. На хвостовому кінці добре помітне преанальне вздуття кутикули, присутній довгий мукральний шип, біля 15 мкм.

Досліджені шість *інвазійних личинок*: довжина тіла – 868 ± 104 (762-1000); товщина – 35 ± 2 (33-38); довжина хвоста – 91 ± 5 (88-100); довжина стравоходу – 117 ± 11 (100-128); відстань до екскреторної пори – 61 ± 8 (53-73); відстань до нервового кільця – 85 ± 8 (78-100); довжина гіалінового кінця – 30 ± 1 (30-33). Вирахувано коефіцієнти: $D\% = 52 \pm 5$ (44-57); $E\% = 67 \pm 9$ (57-83); $a = 25 \pm 3$ (20-28); $b = 7 \pm 1$ (6-9); $c = 10 \pm 1$ (8-11); $H\% = 33 \pm 1$ (32-34).

***S. feltiae* ізолят Кан (Рис. 4.6)**

Досліджені десять *самців I генерації*: довжина тіла становить 952 ± 75 (865-1074); діаметр – 79 ± 16 (62-110); відстань від клоаки до кінця хвоста – 30 ± 4 (25-38); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 132 ± 9 (118-143); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 84 ± 6 (75-98); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 83 ± 6 (73-95); довжина губернакулуму – 45 ± 2 (40-48); довжина спікул – 67 ± 4 (63-73); товщина тіла на рівні клоаки – 41 ± 7 (33-55); Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами: $D\% = 64 \pm 5$ (56-70); $GS\% = 67 \pm 5$ (57-72); $SW\% = 166 \pm 29$ (127-215). Мукральний шип на хвості відсутній.

Досліджені десять *самців II генерації*: довжина тіла – 652 ± 53 (549-730); діаметр – 59 ± 8 (52-78); відстань від клоаки до кінця хвоста – 28 ± 2 (23-31); довжина стравоходу – 117 ± 5 (109-125); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 70 ± 6 (62-78); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 92 ± 5 (83-99); довжина губернакулуму – 34 ± 2 (31-36); довжина спікул – 51 ± 4 (47-57); товщина тіла на рівні клоаки – 28 ± 3 (23-34); Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами: $D\% = 60 \pm 7$ (51-71); $GS\% = 66 \pm 7$ (60-77); $SW\% = 182 \pm 17$ (151-212).

Досліджені десять *самиці I генерації*: довжина тіла становить 4116 ± 541 (3190-4960); діаметр – 156 ± 38 (115-242); відстань від анусу до кінця хвоста – 54 ± 7 (47-65); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 189 ± 14 (169-208); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 84 ± 8 (73-94); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 129 ± 9 (117-140); відстань від апікального кінця до вульви – 2179 ± 281 (1710-2640); діаметр тіла на рівні анусу – 61 ± 8 (55-

75); Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами: $D\% = 45 \pm 5$ (38-52) та $V\% = 54 \pm 3$ (50-59)

Досліджені десять *самиці II генерації*: довжина тіла становить 1361 ± 156 (1080-1590); діаметр – 107 ± 13 (83-122); довжина хвоста – 55 ± 8 (42-65); довжина стравоходу – 135 ± 14 (117-153); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 73 ± 6 (65-81); відстань від апікального кінця до нервового кільця – 105 ± 12 (83-122); відстань від апікального кінця до вульви – 731 ± 131 (460-880); діаметр тіла на рівні анусу – 38 ± 6 (31-52). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами: $D\% = 54 \pm 5$ (48-64) та $V\% = 54 \pm 6$ (43-65).

Досліджені дві *інвазійні личинки*: довжина тіла – 723-752; діаметр – 30-33; довжина хвоста – 70-78; довжина стравоходу – 120-125; відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 70-78; відстань від апікального кінця до нервового кільця – 85-88; довжина гіалінового кінця – 28-33. Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтами: $D\% = 56-65$; $E\% = 90-111$; $a = 23-24$; $b = 6$; $c = 10$; $H\% = 35-46$.

***S. feltiae* ізолят Kar-4**

Досліджено 25 *інвазійних личинок*: довжина тіла становить 700 ± 37 (633–784); діаметр – 33 ± 2 (30–36); довжина хвоста – 77 ± 3 (70–84); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 111 ± 4 (104–118); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 51 ± 4 (43–62); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 90 ± 5 (81–104); довжина гіалінового кінця – 33 ± 2 (30–36). Вирахувано коефіцієнти: $D\% = 46 \pm 4$ (39–58); $E\% = 66 \pm 5$ (58–83); $a = 21 \pm 1$ (19–24); $b = 6$ (6–7); $c = 9 \pm 1$ (9–11).

***S. feltiae* ізолят Kar-13**

Досліджені десять *самців II генерації*: $L = 867 \pm 114$ (694-1064); товщина – 61 ± 15 (39-84); відстань від клоаки до кінця хвоста – 21 ± 3 (19-25); довжина стравоходу – 160 ± 11 (140-174); довжина губернакулуму – 45 ± 4 (37-50); довжина спікул – 62 ± 4 (54-70). Особини ізоляту відмінні від особин інших ізолятів коефіцієнтом $GS\% = 73 \pm 9$ (59-86). Мукральний шип присутній.

Досліджено 25 інвазійних личинок: $L = 851 \pm 48$ (762–958); діаметр – 32 ± 3 (26–39); довжина хвоста – 85 ± 4 (78–90); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 126 ± 5 (119–133); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 61 ± 5 (54–78); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 97 ± 3 (90–102); довжина гіалінового кінця – 31 ± 2 (30–35). Вираховано коефіцієнти: $D\% = 48 \pm 4$ (43–61); $E\% = 72 \pm 6$ (63–88); $a = 27 \pm 3$ (23–35); $b = 7 \pm 0$ (6–7); $c = 10 \pm 1$ (9–11);

***S. feltiae* ізолят КМ (Рис. 4.5, 4.7)**

Досліджені одинадцять самців II генерації: довжина тіла становить 901 ± 73 (750–1019); діаметр – 71 ± 15 (56–101); відстань від клоаки до кінця хвоста – 26 ± 3 (20–31); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 135 ± 8 (124–146);



Рис. 4.7. *Steinernema feltiae* ізолят КМ: А – самиця I генерації; Б – самець I генерації; В – dauer-личинка. Масштабна риска – 100 мкм.

довжина губернакулуму – 45 ± 1 (43–47); довжина спікул – 59 ± 2 (56–61).
Вирахувано коефіцієнт $GS\% = 76 \pm 2$ (74–81). Мукральний шип довгий (≈ 13 мкм).

Досліджено 25 інвазійних личинок: довжина тіла – 867 ± 19 (840–896); діаметр – 27 ± 1 (25–31); довжина хвоста – 85 ± 5 (76–99); довжина стравоходу – 130 ± 4 (124–140); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 62 ± 3 (57–67); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 92 ± 4 (85–101); довжина гіалінового кінця – 39 ± 2 (35–41). Вирахувано коефіцієнти: $D\% = 48 \pm 2$ (42–52); $E\% = 73 \pm 4$ (66–83); $a = 32 \pm 2$ (29–36); $b = 7 \pm 2$ (6–7); $c = 10 \pm 1$ (9–12);

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, KM було надано номери доступу KF939328.1-KF939331.1.

Сіквенси виділених культур ЕПН надано в Додатку Г.

Філогенетичні відносини між ізолятами.

На основі об'єднаних та вирівняних послідовностей було побудовано матрицю ідентичності (див. Таблицю 4.4).

Послідовності, які мали ідентичність з зовнішньою групою більше 42 % були використані для побудови філогенетичного дерева (Рис. 4.8), що відображає зв'язки в групі виділених на території України ізолятів *S. feltiae*.

Побудоване дерево свідчить про поліфілію знайдених у Україні ізолятів ЕПН. Поліморфізм по сіквенсованій ділянці рДНК виключає можливість філогенічного тлумачення про географічне 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.

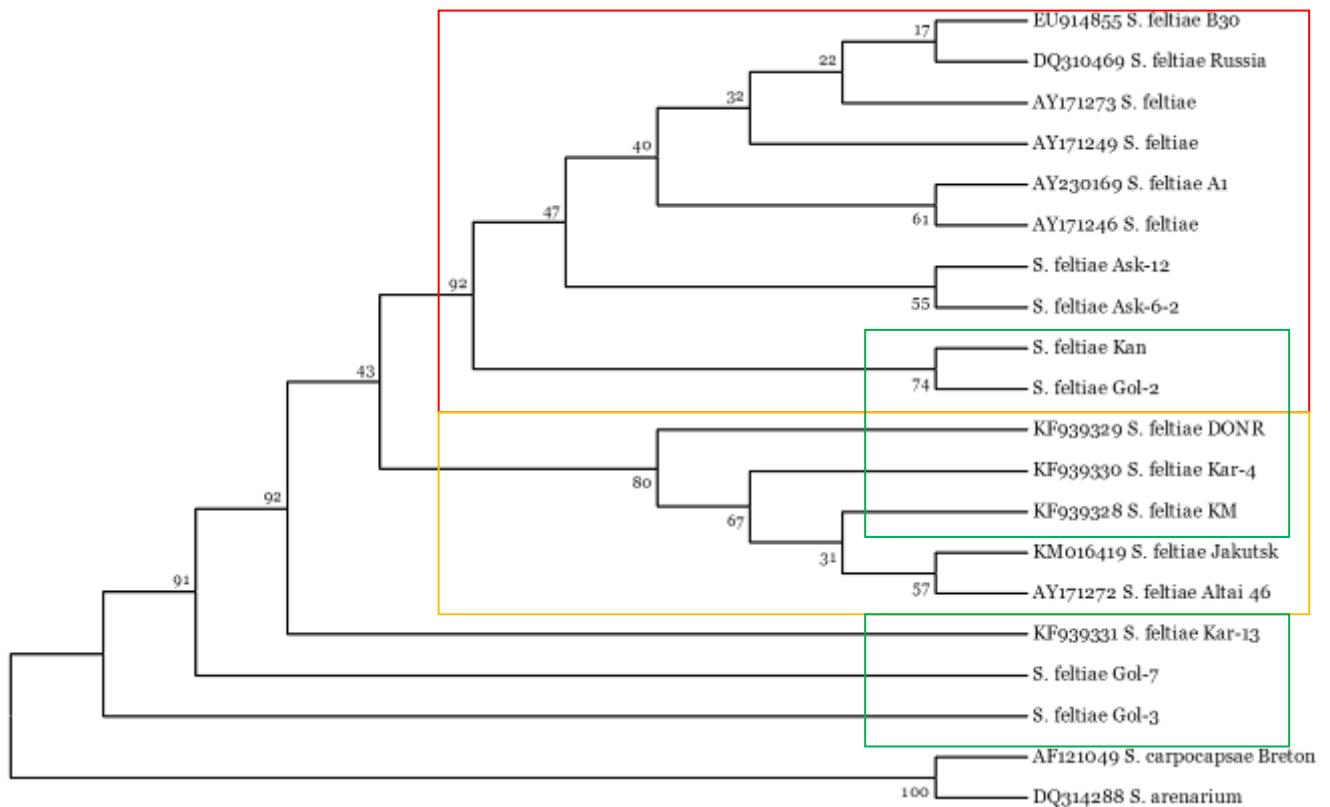


Рис. 4.8. Філогенетичні зв'язки всередині групи *S. feltiae* України. Дерево побудоване методом мінімуму еволюції, ME (в вузлах вказані р-дистанції; Close-Neighbor-Interchange).

Таблиця 4.4

Таблиця ідентичності сіквенсів виділених ізолятів *S. feltiae*.

	#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>S. carpocapsae</i> , AF121049	1	Ід																			
<i>S. arenarium</i> , DQ314288	2	72,2	Ід																		
<i>S. feltiae</i> , KM016419	3	71,8	71,8	Ід																	
<i>S. feltiae</i> , EU914855	4	71,7	71,3	99,1	Ід																
<i>S. feltiae</i> , DQ310469	5	71,7	71,3	99,1	100,0	Ід															
<i>S. feltiae</i> , AY230169	6	70,8	70,6	97,1	98,0	98,0	Ід														
<i>S. feltiae</i> , AY171273	7	71,7	71,1	98,9	99,8	99,8	97,8	Ід													
<i>S. feltiae</i> , AY171272	8	71,8	71,8	99,6	99,1	99,1	97,1	98,9	Ід												
<i>S. feltiae</i> , AY171249	9	71,5	71,1	98,9	99,8	99,8	97,8	99,6	98,9	Ід											
<i>S. feltiae</i> , AY171246	10	71,3	71,0	98,7	99,6	99,6	97,8	99,4	98,7	99,4	Ід										
<i>S. feltiae</i> , KF939329	11	72,2	72,2	99,6	99,1	99,1	97,1	98,9	99,6	98,9	98,7	Ід									
<i>S. feltiae</i> , KF939330	12	72,0	72,0	99,8	99,2	99,2	97,3	99,1	99,8	99,1	98,9	99,8	Ід								
<i>S. feltiae</i> , KF939331	13	71,8	72,0	99,4	98,9	98,9	97,0	98,7	99,4	98,7	98,5	99,4	99,6	Ід							
<i>S. feltiae</i> , KF939328	14	72,0	72,0	99,8	99,2	99,2	97,3	99,1	99,8	99,1	98,9	99,8	100,0	99,6	Ід						
<i>S. feltiae</i> , ізолят Кан	15	71,5	71,0	98,7	99,4	99,4	97,5	99,2	98,7	99,2	99,1	98,7	98,9	98,5	98,9	Ід					
<i>S. feltiae</i> , ізолят Gol-3	16	68,5	68,7	91,9	92,7	92,7	91,2	92,6	91,9	92,7	92,4	91,9	92,0	92,2	92,0	92,9	Ід				
<i>S. feltiae</i> , ізолят Gol-2	17	71,5	71,1	98,9	99,6	99,6	97,7	99,4	98,9	99,4	99,2	98,9	99,1	98,7	99,1	99,8	92,7	Ід			
<i>S. feltiae</i> , ізолят Ask-12	18	71,8	71,0	98,7	99,6	99,6	97,7	99,4	98,7	99,4	99,2	98,7	98,9	98,5	98,9	99,4	93,1	99,2	Ід		
<i>S. feltiae</i> , ізолят Ask-6-2	19	71,8	71,1	98,9	99,8	99,8	97,8	99,6	98,9	99,6	99,4	98,9	99,1	98,7	99,1	99,2	92,9	99,4	99,8	Ід	
<i>S. feltiae</i> , ізолят Gol-7	20	69,4	68,7	95,2	94,7	94,7	93,1	94,5	95,2	94,5	94,3	95,2	95,4	95,4	95,4	94,3	89,8	94,5	94,3	94,5	Ід

Примітки: Ід – ідентичні; червоним кольором виділено результати в діапазоні 99,0-100,0 %, жовто-гарячим – 98,0-98,9 %, жовтим – 90,0-97,9 %, зеленим – побічну групу; напівжирним шрифтом виділено ізоляти з України.

4.2.3. 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.

Самців нематод було вибрано через більшу кількість наявних репрезентативних даних, ніж для самиць чи інших стадій розвитку. Окрім того, самці (II генерації) та інвазійні личинки в значній мірі використовуються для визначення видів *Steinernema*.

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 та ураженням їх органів та систем (Рис. 4.9).



Рис. 4.9. Початок грибкового ураження видом *Trichoderma* sp. личинки 4-го віку ЕПН виду *S. arenarium*.

Таблиця 4.5.

Узагальнені результати аналізу дискримінантних функцій для самців I генерації.

Загальна Лямбда Вілкса: 0,00026, $p < 0,0000$. Тут і далі для таблиць аналізу дискримінантних функцій сірим кольором позначено рядки з вірогідним значенням p ($p < 0,050$).

	Wilks' - Lambda	Partial – Lambda	F-remove - (5,45)	p-level	Toler.	1-Toler. - (R-Sqr.)
L	0,001	0,272	24,054	0,000	0,570	0,430
W	0,001	0,457	10,702	0,000	0,535	0,465
EP	0,001	0,246	27,563	0,000	0,613	0,387
NR	0,001	0,217	32,421	0,000	0,356	0,644
ES	0,001	0,238	28,842	0,000	0,339	0,661
T	0,000	0,864	1,422	0,235	0,642	0,358
SL	0,000	0,814	2,051	0,089	0,861	0,139
GL	0,001	0,444	11,287	0,000	0,741	0,259

Таблиця 4.6.

Результати аналізу по Хі-квадрат для самців I генерації.

	Eigen-value	Canonical - R	Wilks' – Lambda	Chi-Sqr.	df	p-level
0	19,040	0,975	0,000	413,293	40	0,000
1	5,457	0,919	0,005	263,406	28	0,000
2	3,514	0,882	0,033	170,143	18	0,000
3	2,568	0,848	0,150	94,781	10	0,000
4	0,866	0,681	0,536	31,180	4	0,000

Як видно з Таблиць 4.5 і 4.6, самці I генерації вірогідно відрізняються за усіма номінальними морфометричними параметрами, крім “T” та “SL”. На основі коренів «0» ($\chi^2=413$) та «1» ($\chi^2=263$) було побудовано відповідний графік порівняння (Рис. 4.10).

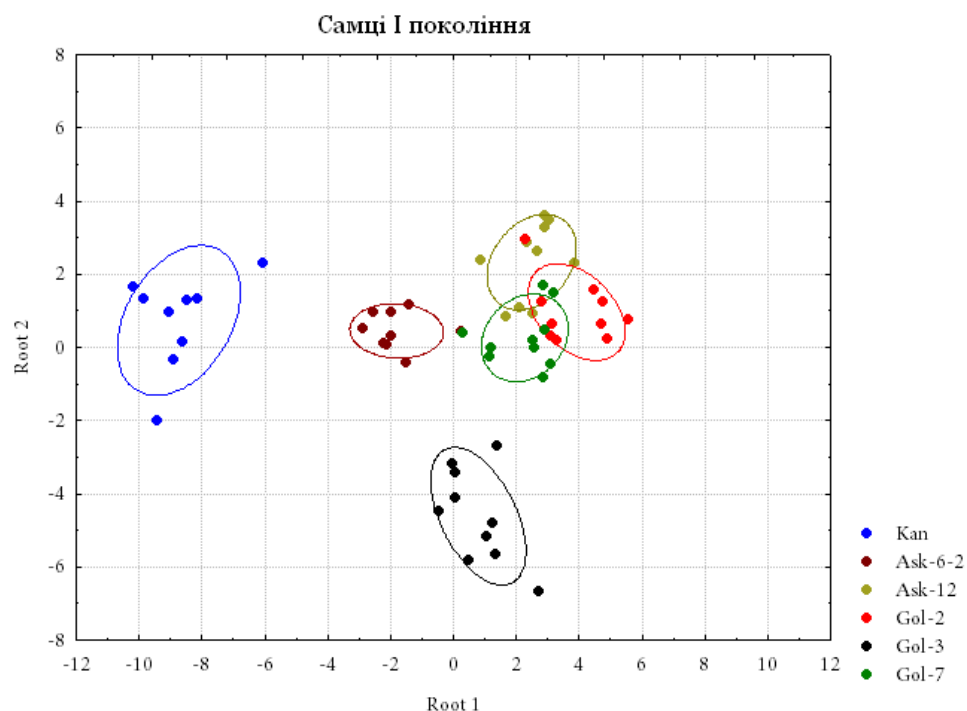


Рис. 4.10. Аналіз канонічних змінних для самців I генерації ізолятів виду *S. feltiae*. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95).

Таблиця 4.7.

Узагальнені результати аналізу дискримінантних функцій для самців II генерації.

Загальна Лямбда Вілкса: 0,004, $p < 0,000$.

	Wilks' - Lambda	Partial - Lambda	F-remove - (5,42)	p-level	Toler.	1-Toler. - (R-Sqr.)
L	0,008	0,499	8,435	0,000	0,746	0,254
W	0,005	0,785	2,304	0,062	0,769	0,231
ES	0,013	0,330	17,025	0,000	0,877	0,123
T	0,009	0,488	8,825	0,000	0,665	0,335
SL	0,011	0,391	13,090	0,000	0,753	0,247
GL	0,006	0,717	3,315	0,013	0,849	0,151

Таблиця 4.8.

Результати аналізу по Хі-квадрат для самців II генерації.

	Eigen-value	Canonical - R	Wilks' - Lambda	Chi-Sqr.	df	p-level
0	16,872	0,972	0,004	251,947	30	0,000
1	2,156	0,827	0,075	119,317	20	0,000

	Eigen- value	Canonicl - R	Wilks' - Lambda	Chi- Sqr.	df	p-level
2	1,308	0,753	0,236	66,445	12	0,000
3	0,582	0,607	0,544	27,979	6	0,000
4	0,161	0,373	0,861	6,877	2	0,032

Самці II генерації вірогідно відрізняються за усіма показниками крім “W”, подібність збільшується для показників “ES” та “SL”. На основі коренів «0» ($\chi^2=252$) та «1» ($\chi^2=119$) було побудовано відповідний графік порівняння (Рис. 4.11).

Як видно з графіків співставлення функцій канонічних змінних, 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-KM-Kar-13» та «Gol-2-Gol-7-Kan».

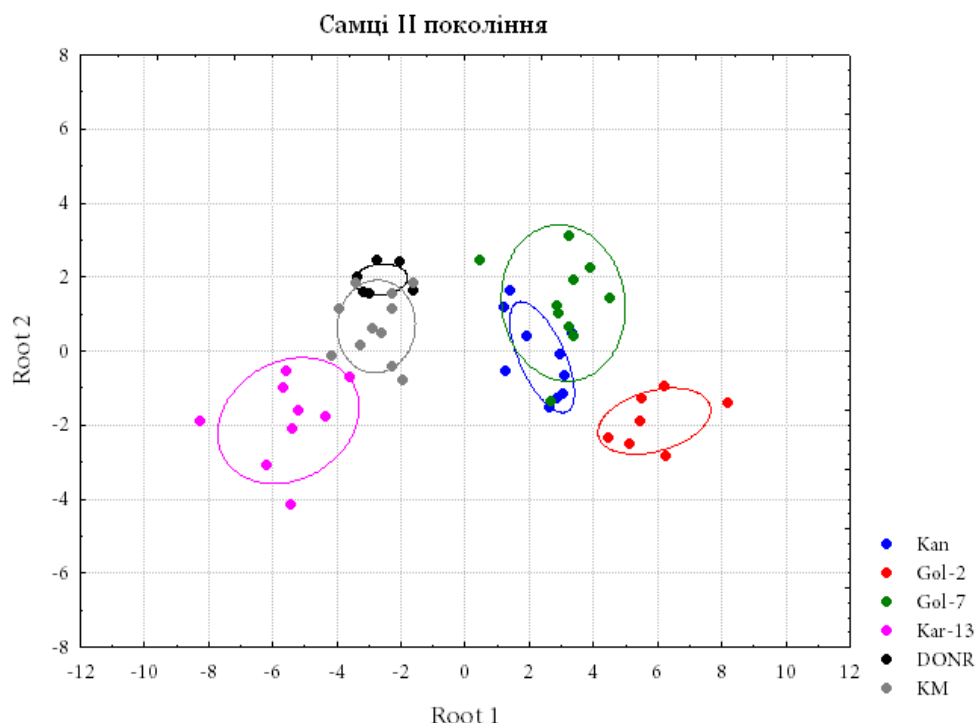


Рис. 4.11. Аналіз канонічних змінних для самців II генерації ізолятів виду *S. feltiae*. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95).

Характерно, що близькі територіально ізоляти потрапляють до різних груп. Ізолят Кап в I-й генерації знаходиться індивідуально, але в II-й вливається до групи з Голосіївського НПП.

Не виявлено закономірності у групуванні з територією виділення ізолятів, оскільки до даних груп потрапляють ізоляти, територіально розділені більше ніж на 600 км («Ask-12-Gol-2-Gol-7»).

4.2.4. Ізолят *Steinernema* sp. U2

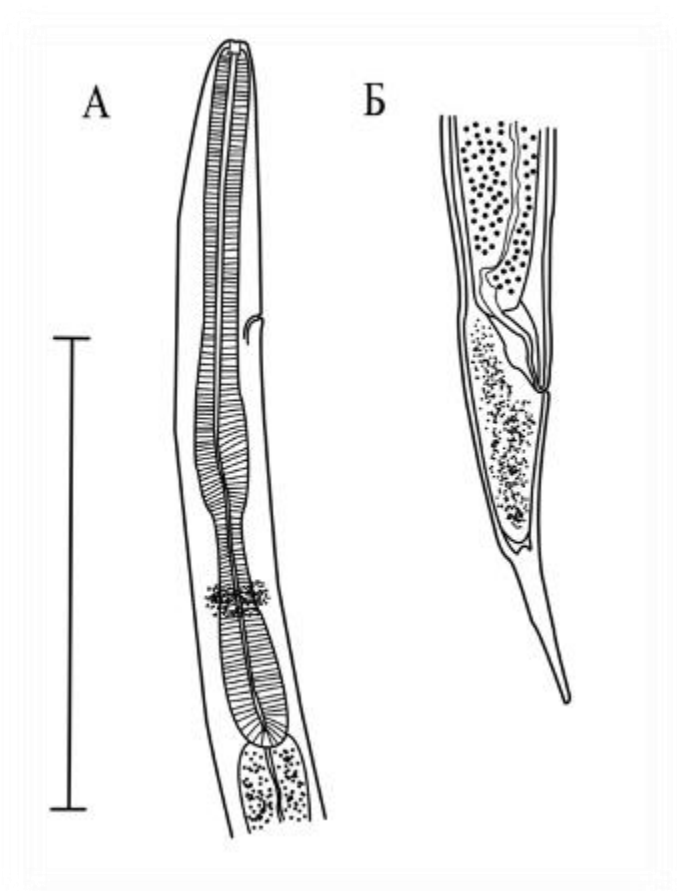


Рис. 4.12. Апікальний (А) та каудальний (Б) полюси інвазійної личинки ізоляту *Steinernema* sp. U2. Масштаб 100 мкм.

Субстрат: вологий пісчаний.

Поширення: було виявлено в околицях с. Колочава Закарпатської області (проба У2).

Морфометрія. Досліджено одинадцять інвазійних личинок: довжина тіла становить 643 ± 39 (553-690); діаметр – 25 ± 2 (23-28); відстань від апікального кінця до екскреторної пори – 59 ± 3 (53-63); відстань від апікального кінця до кінця стравоходу – 146 ± 15 (125–175); відстань від верхів'я апікального кінця до нервового кільця – 80 ± 4 (73–85); довжина хвоста – 68 ± 3 (63-73).

Вираховано коефіцієнти: $a = 26 \pm 2$ (20-28); $b = 5 \pm 1$ (4-5); $c = 10 \pm 1$ (9-10); $D\% = 41 \pm 5$ (34-48); $E\% = 87 \pm 4$ (82-96).

Нематоди з вибірки У2 представлені видом *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900, самцями, самицями та личинками Diplogastridae, видом *Acrobeloides buetschlii* (de Man, 1884) Steiner та

Buhrer, 1933 та личинками ЕПН з роду *Steinernema*. Даний факт вказує на те, що гусінь *Galleria mellonella* була вдало заражена личинками ЕПН, але згодом їх розвиток був подавлений сапробіонтними видами нематод.

Близькими за морфометричними параметрами до даних нематод є види ЕПН *S. affine*, *S. bicornutum* та *S. carpocapsae*. Виявлено, що у личинок ЕПН з даної вибірки відсутні характерні для ІІ *S. bicornutum* зерноподібні структури на передньому кінці тіла (які являють собою залишки кутикули, що залишилися після 2-го линяння) та характерний для личинок *S. affine* рефрактерний шип у хвостовому кінці тіла. Виявлено, що базальний бульбус видовжений при основі. Виходячи з отриманих даних, можна припустити, що гусінь *Galleria mellonella* була заражена личинками *S. carpocapsae*.

4.3. Поширення ентомопатогенних нематод

4.3.1. Розподіл ентомопатогенних нематод світу за біогеографічними областями

Аналізуючи географію поширення ентомопатогенних нематод, можна стверджувати, що ЕПН поширені в усіх біогеографічних областях окрім Арктики, Антарктики та Субантарктичних островів.

Протягом останнього часу дослідження ЕПН значно активізувались. Постійно описуються нові види. Відповідно до останніх даних, ентомопатогенні нематоди родів *Steinernema* та *Heterorhabditis* зареєстровані у 72 країнах світу.

Мною було складено актуальний список валідних видів у складі групи ЕПН та проаналізовано їх поширення у країнах світу.

До складу родини Steinernematidae входять два роди: *Steinernema* (88 видів нематод) та *Neosteinernema* Nguyen та Smart, 1994 (1 вид, - *N. longicurvicaudum* Nguyen та Smart, 1994 (Nguyen та Smart, 1994)).

Види роду *Steinernema*:

S. abbasi Elawad, Ahmad et Reid, 1997; *S. aciari* Qiu, Yan, Zhou, Nguyen et Pang, 2005; *S. affine* (Bovien, 1937) Wouts, Mráček, Gerdin et Bedding, 1982; *S. akhursti* Qiu, Hu, Zhou, Mei, Nguyen et Pang, 2005; *S. anatoliense* Hazir, Stock et

Keskin, 2003; *S. apuliae* Triggiani, Mráček *et* Reid, 2004; *S. arenarium* (Artyukhovsky, 1967) Wouts, Mráček, Gerdin *et* Bedding, 1982; *S. ashiuense* Phan, Takemoto *et* Futai, 2006; *S. asiaticum* Anis, Shanina, Reid *et* Rowe, 2002; *S. australe* Edgington, Buddie, Tymo, Hunt, Nguyen, France, Merino *et* Moore, 2009; *S. backanense* Phan, Spiridonov, Subbotin *et* Moens, 2006; *S. beddingi* Qiu, Hu, Zhou, Pang *et* Nguyen, 2005; *Steinernema beitlechemi* Çimen Půža, Nermut', Hatting, Ramakuwela, Faktorowa *et* Hazir, 2016; *S. bicornutum* Tallosi, Peters *et* Ehlers, 1995; *Steinernema biddulphi* Cimen, Půža, Nermut', Hatting, Ramakuwela *et* Hazir, 2016; *S. bifurcatum* Fayyaz, Yan, Qiu, Han, Gulsher, Khanum *et* Javed , 2014; *S. boemarei* Lee, Sicard, Skeie *et* Stock, 2009; *S. brazilense* Nguyen, Ginarte, Leite, dos Santos *et* Harakava, 2010; *S. cameroonense* Kanga, Trinh, Waeyenberge, Spiridonov, Hauser *et* Moens, 2012; *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mráček, Gerdin *et* Bedding, 1982; *S. caudatum* Xu, Wang *et* Li, 1991; *S. ceratophotum* Jian, Reid *et* Hunt, 1997; *S. changbaiense* Ma, Chen, De Clercq, Han *et* Moens, 2012; *S. cholashanense* Nguyen, Půža *et* Mráček, 2008; *S. citrae* Stokwe, Malan, Nguyen, Knoetze *et* Tiedt, 2011; *S. colombiense* López-Núñez, Plichta *et* Góngora-Botero, 2008; *S. costaricense* Uribe-Lorío, Mora *et* Stock, 2007; *S. cubana* Mráček, Herntaez *et* Boemare, 1994; *S. cumgareense* Phan, Spiridonov, Subbotin *et* Moens, 2006; *S. diaprepesi* Nguyen *et* Duncan, 2002; *S. dharanaii* Kulkarni, Rizvi, Kumar, Paunikar *et* Mishra, 2012; *S. eapokense* Phan, Spiridonov, Subbotin *et* Moens, 2006; *S. ethiopiense* Tamiru, Wayennberge, Hailu, Ehlers, Půža *et* Mráček, 2012; *S. everestense* Khatri-Chhetri, Wayenberge, Spiridonov, Mantahar *et* Moens, 2011; *Steinernema fabii* Abate, Malan, Tiedt, Wingfield, Slippers *et* Hurley, 2016); *S. feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mráček, Gerdin *et* Bedding, 1982; *S. glaseri* (Steiner, 1929) Wouts, Mráček, Gerdin *et* Bedding, 1982; *Steinernema goweni* San-Blas, Morales-Montero, Portillo, Nermut' *et* Půža, 2016; *S. guangdongense* Qiu, Hu, Zhou, Pang *et* Nguyen, 2004; *S. hebeiense* Chen, Li, Yan, Spiridonov *et* Moens, 2006; *S. hermaphroditum* Stock, Griffin *et* Chaerani, 2004; *S. huense* Phan, Mráček, Půža, Nermut' *et* Jarošová, 2014; *S. ichnusae* Tarasco, , Nguyen *et* Triggiani, 2008; *S. intermedium* (Poinar, 1986) Mamiya, 1988; *S. jeffreyense*, Malan, Knoetze *et* Teidt, 2015; *S. jolliei* Spiridonov, Krasomil-Oesterfeld *et* Moens, 2004; *S. kari* Waturu, Hunt

et Reid, 1997; *S. khoisanae* Nguyen, Malan et Gozel, 2006; *S. kraussei* (Steiner, 1923) Travassos, 1927; *S. kushidai* Mamiya, 1988; *S. lamjungense* Khatri-Chhetti, Wayenberge, Spiridonov, Mantahar et Moens, 2011; *S. leizhouense* Nguyen, Qiu, Zhou et Pang, 2006; *S. litorale* Yoshida, 2005; *S. loci* Phan, Nguyen et Moens, 2001; *S. longicaudum* Shen et Wang, 1992; *S. maqbooli* Fayyaz, Khanum, Gulsher et Javed, 2013; *S. monticolum* Stock, Choo et Kaya, 1997; *S. mushtaqi* Pervez, Ali et Asif, 2009; *S. neocurtillis* Nguyen et Smart, 1992; *S. nyetense*, Kanga, Trinh, Waeyenberge, Spiridonov, Hauser et Moens, 2012; *S. oregonense* Liu et Berry, 1996; *S. pakistanense* Shanina, Anis, Reid, Rowe et Maqbool, 2001; *S. papillatum* Nermuť et Půža, 2015; *S. phyllophagae* Nguyen et Buss, 2011; *S. poinari* Mráček, Půža et Nermuť, 2014; *S. puertoricense* Román et Figueroa, 1994; *S. pui* Qiu, Zhao, Wu, Lv et Pang, 2011; *S. puntauense* Uribe-Lorío, Mora et Stock, 2007; *S. quazii* Ali, Shaheen, Asif et Akhtar, 2009; *S. rarum* (de Doucet, 1986) Mamiya, 1988; *Steinernema ralatorei* Grifaldo-Alcantara, Alatorre-Rosas, Segura-León et Herntaez-Rosas, 2017; *S. riobrave* Cabanillas, Poinar et Raulston, 1994; *S. ritteri* de Doucet et Doucet, 1990; *S. robustipiculum* Phan, Subbotin, Wayenberge et Moens, 2005; *Steinernema sacchari* Nthenga, Knoetze, Berry, Tiedt et Malan, 2014; *S. sangi* Phan, Nguyen et Moens, 2001; *S. sasonense* Phan, Spiridonov, Subbotin et Moens, 2006; *S. scapterisci* Nguyen et Smart, 1990; *S. scarabaei* Stock et Koppenhöfer, 2003; *S. schliemanni* Spiridonov, Waeyenberge et Moens, 2010; *S. siamkayai* Stock, Samsook et Reid, 1998; *S. sichuanense* Mráček, Nguyen, Tailliez, Boemare et Chen, 2006; *S. silvaticum* Sturhan, Spiridonov et Mráček, 2005; *S. tami* Luc, Nguyen, Reid et Spiridonov, 2000; *S. texanum* Nguyen, Stuart, Taalo, Gozel et Rogers, 2007; *S. thanhi* Phan, Nguyen et Moens, 2001; *S. thermophilum* Ganguly et Singh, 2000; *S. tielingense* Ma, Chen, Xiuhua, Han, Khatri-Chhetri, de Clercq et Moens, 2012; *S. tophus* Çimen, Lee, Hatting, Hazir et Stock, 2014; *S. vulcanicum* Clausi, Longo, Rappazzo, Tarasco et Vinciguerra, 2011; *S. unicornum* Edgington, Buddie, Tymo, France, Merino et Hunt, 2009; *S. websteri* Cutler et Stock, 2003; *S. weiseri* Mráček, Sturhan et Reid, 2003; *S. xueshanense* Mráček, Qi-zhi et Nguyen, 2009; *S. yirgalemense* Nguyen, Tesfamariam, Gozel, Gaugler et Adams, 2004.

До родини Heterorhabditidae належать 2 роди: *Heterorhabditis* складом 20 видів нематод та *Heterorhabditoides* 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).

До роду *Heterorhabditis* входять наступні види:

H. amazonensis Anhaló, Nguyen et Moino, 2007; *H. argentinensis* Stock, 1993; *H. atacamensis* Edgington, Buddie, Moore, France, Merino et Hunt, 2011; *H. bacteriophora* Poinar, 1976; *H. baujardii* Phan, Subbotin, Nguyen et Moens, 2003; *H. beicherriana* Xing-Yue, Qi-Zhi, Nermut, Půža et Mráček, 2014; *H. brevicaudis* Hsieh, Tzeng, Tseng, Tsai, Meng, Kao, 2009; *H. downesi* Stock, Griffin et Burnell, 2002 ; *H. hambletoni* (Pereira, 1937); *H. floridensis* Nguyen, Gozel, Koppenhöfer et Adams, 2006; *H. georgiana* Nguyen, Shapiro-Ilan et Mbata, 2008; *H. gerrardi* Plichta, Joyce, Clarke, Waterfield, Nicholas et Stock, 2009; *H. indica* Poinar, Karunakar et David, 1992; *H. marelatus* Liu et Berry, 1996; *H. megidis* Poinar, Jackson et Klein, 1987; *H. mexicana* Nguyen, Shapiro-Ilan, Stuart, McCoy, James et Adams, 2004; *H. noenieputensis* Malan, Knoetze et Tiedt, 2014; *H. sonorensis* Stock et Rivera-OrduñoFlores-Lara, 2009; *H. taysearae* Shamseldean, Abou El-Sooud, Abd-Elgawad et Saleh, 1996; *H. zealmaica* Poinar, 1990.

Найбільша кількість видів *Steinernema* представлена у Китайській Народній Республіці, КНР (19 видів), *Heterorhabditis* – у Сполучених Штатах Америки (7 видів), загалом, найбільшу кількість видів знайдено у КНР – 23 види.

ЕПН широко представлені в Індो-Малазійській області (39 видів роду *Steinernema* та 5 видів з роду *Heterorhabditis*) та Палеарктиці (34 вид роду *Steinernema* та 6 видів з роду *Heterorhabditis*). Менше видів виявлено в Неотропічній (19 видів роду *Steinernema* та 9 видів з роду *Heterorhabditis*), та Неарктичній (13 видів роду *Steinernema* та 7 видів з роду *Heterorhabditis*) біогеографічних областях (Рис. 4.13). Афротропічна та Австралійська області, очевидно вивчені недостатньо, оскільки у них виявлено мало видів ЕПН (16 та 2 види роду *Steinernema*, 6 та 4 видів з роду *Heterorhabditis* відповідно).

Окрім ступеню вивченості фауни ЕПН в різних країнах, подібний розподіл

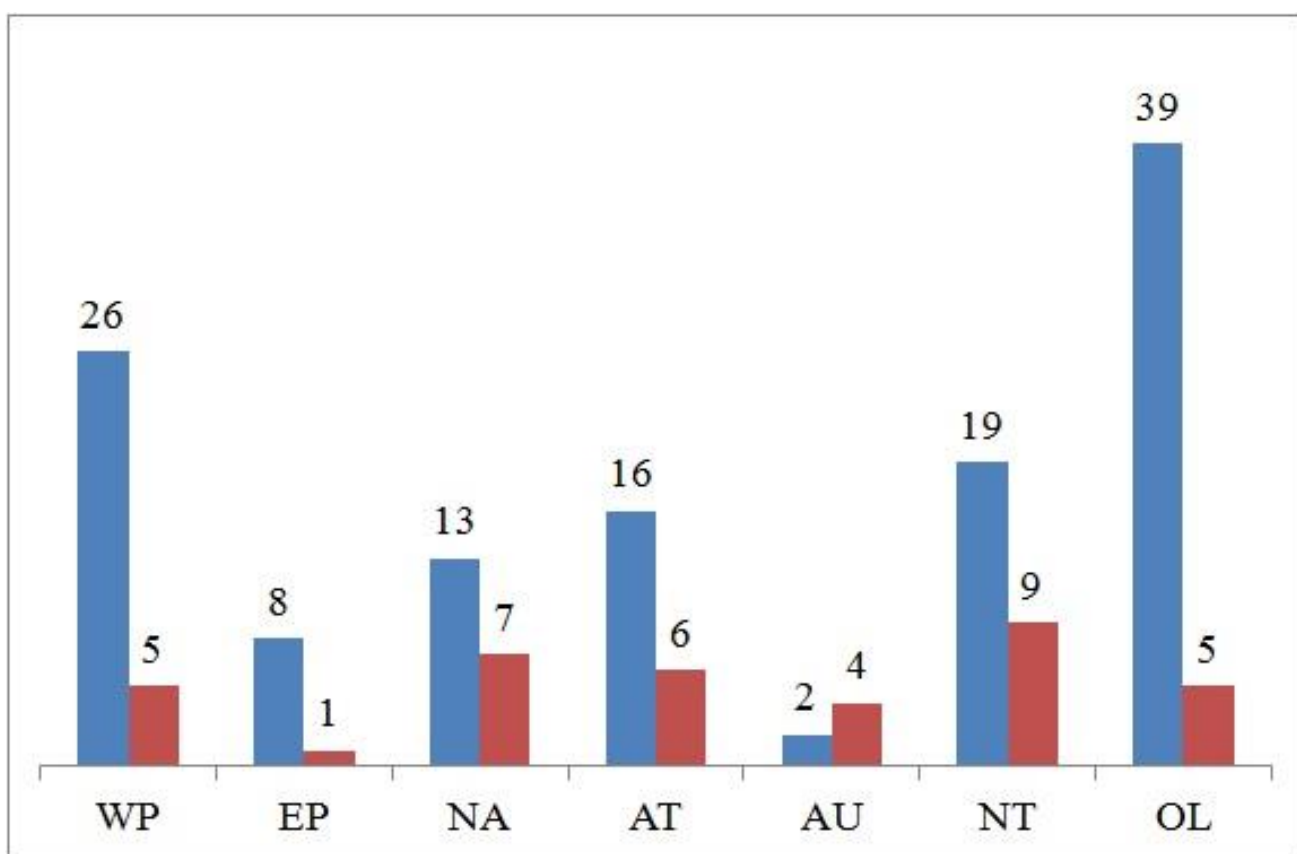


Рис. 4.13. Розподіл видів ЕПН за біогеографічними областями. Синім кольором позначено рід *Steinernema*, червоним – рід *Heterorhabditis*. Кількість видів кожного роду показана на діаграмі. Позначення: WP – Західна Палеарктична біогеографічна область (б. о.); EP – Східна Палеарктична б.о.; NT – Неотропічна б. о.; OL – Індो-Малазійська б. о.; NA – Неарктична б. о.; AT – Афротропічна б. о.; AU – Австралійська б. о. (Оригінал)

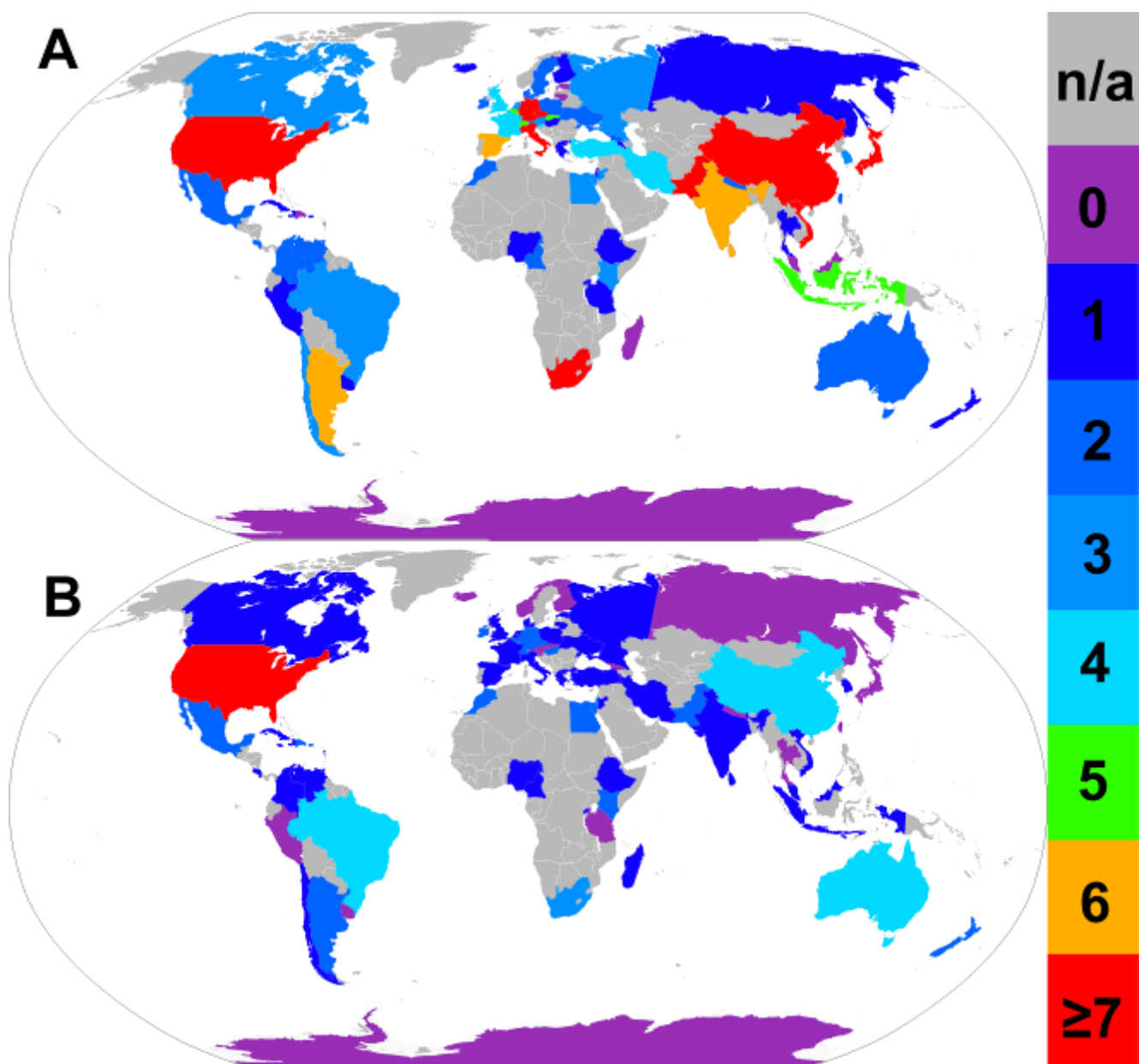


Рис. 4.14. Мапа, що відображає кількість видів ЕПН обох родин, виділених з різних країн світу. А – *Steinernema*; В – *Heterorhabditis*; n/a – інформація відсутня або дослідження не проводились. (Оригінал, подано за (Yakovlev та Kharchenko, 2016)).

ЕПН за біогеографічними областями можна пов'язати з чутливістю цих нематод до кліматичних факторів, стратегіями пошуку хазяїв інвазійними личинками та ступенем накопичення поживних речовин ІЛ. Нематоди з роду *Steinernema* відрізняються меншою чутливістю до низьких температур та збільшеним, відносно роду *Heterorhabditis* енергетичним пулом (Данилов, 2005). Так для нематод з роду *Heterorhabditis* характерна тактика «курсуючих» ІЛ, що

характеризуються високою активністю та чутливістю до хімічних маркерів (CO₂, NH₄OH (Shapiro *та ін.*, 2000), інших продуктів метаболізму комах). ЕПН із такою тактикою витрачають енергетичний резерв швидше, аніж ЕПН із тактикою «чатування», характерною для ІЛ нематод з роду *Steinernema* (Campbell *та ін.*, 2003). Різниця в стратегіях пошуку хазяїв зумовлює морфологічні відмінності між ЕПН. Більш докладно вплив факторів зовнішнього середовища на розповсюдження ЕПН викладено в главі «Залежність поширення ЕПН від біотичних та абіотичних факторів».

Причиною різного поширення та видового різноманіття родів *Steinernema* та *Heterorhabditis* Адамс та інші (Adams, Peat та Dillman, 2007) на основі аналізу віку симбіонтів роду *Xenorhabdus*, молекулярних та морфологічних даних, виділяють різний вік родин ЕПН – родина *Steinernematidae* виникла приблизно 350 млн. років тому на відміну від родини *Heterorhabditidae*, яка, згідно досліджень, теоретично молодша та мала менше часу на утворення нових видів.

Широко зустрічаються наступні види ентомопатогенних нематод: *H. indica* (даний вид було спорадично виявлено у 20 країнах з шести біогеографічних областей), *H. bacteriophora* (космополіт, знахідки якого охоплюють Палеарктику, Неарктику, Неотропічну, Афротропічну та Австралійську області і, загалом, 32 країни), *S. carpocapsae* (ареал виду охоплює 31 країну у Палеарктиці, Неарктиці, Неотропічній та Австралійській областях) та *S. feltiae* (вид було виділено у 37 країнах Палеарктики, Неотропічної, Індонезійської та Австралійської областей). Значно обмеженіші ареали видів *H. megidis*, *S. kraussei*, *S. intermedium*, *S. longicaudum* (поширені у регіонах Голарктики), *H. baujardi* (вид виявлено у Неотропічній та Індонезійській областях), *H. zealandica* (відмічені у Палеарктиці та Австралійській області), *S. glaseri*, *S. websteri* (зустрічаються у районах Палеарктики та Неотропічній області), *S. weiseri* (окрім Палеарктики була виділена з Афротропічної області). Часто ЕПН виділяють спорадично, так 96 видів родів *Heterorhabditis* та *Steinernema* поширені в межах однієї країни у різних біогеографічних областях (Рис. 4.14).

Проте, картина поширення видів ЕПН далека від істинної і значущо залежить від ступеню вивченості фауни ЕПН та розвитку біологічного методу у різних країнах, на що опосередковано вказує велика кількість «білих плям» у поширенні поруч із країнами зі значною кількістю видів ЕПН (Yakovlev та Kharchenko, 2016).

4.3.2. Ентомопатогенні нематоди України та прилеглих територій

Як вже згадувалось, до цього часу в Україні було знайдено лише один вид, статус якого підтверджено за допомогою молекулярно-генетичного аналізу.

Ймовірним є виявлення на території України ентомопатогенних нематод, притаманних фауні Центральної Європи (Рис. 4.15). А саме (джерела станом на 2002 рік цитовано за (Nominick, 2002)):

S. feltiae, вид-космополіт, поширений на території усієї Центральної Європи (Іванова, Данилов та Ивахненко, 2000; Климов *и др.*, 2010; Самсонова, Косевич та Спиридонов, 2010; Jaworska та Dudek, 1992; Laznik *та ін.*, 2009; Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Peters, 1996; Půža та Nermut', 2015; Staner та Bednarek, 1987; Sturhan та Liskova, 1999; Tóth, 2006).

S. carpocapsae, виявлена в Австрії (Peters, 1996), Болгарії (Shishiniova, Budurova та Gradinarov, 1998), Німеччині (Ehlers, Deseo та Stackebrot, 1991), Польщі, Росії (Іванова, Данилов та Ивахненко, 2000; Климов *та ін.*, 2010; Fischer-Le Saux *та ін.*, 1998; Poinar, 1990), Словаччині (Sturhan та Liskova, 1999), Словенії (Laznik *та ін.*, 2009), Чехії (Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Půža та Nermut', 2015) та Швейцарії.

H. megidis, ареал якого охоплює території Болгарії (Gradinarov *та ін.*, 2012), Німеччини (Ehlers, Deseo та Stackebrot, 1991), Польщі, Росії (Самсонова, Косевич та Спиридонов, 2010; Fischer-Le Saux *та ін.*, 1998), Угорщині (Tóth, 2006), Чехії (Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Půža та Nermut', 2015) та Швейцарії.

H. bacteriophora, котрий виділено в Болгарії (Gradinarov *та ін.*, 2012), Німеччині (Smits та Ehlers, 1991), Угорщині (Tóth, 2006), Чехії (Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Půža та Nermut', 2015) Росії (Іванова, Данилов та Ивахненко,

2000; Самсонова, Косевич та Спиридонов, 2010) та Швейцарії. Відмічено єдину знахідку з України (Стефановська, 2007).

S. kraussei, виділено з Австрії (Peters, 1996), Німеччини (Steiner, 1923), Польщі (Tumialis *та ін.*, 2014), Словенії (Laznik *та ін.*, 2009), Чехії (Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Půža та Nermut', 2015), Росії (Самсонова, Косевич та Спиридонов, 2010), Болгарії (Shishiniova, Budurova та Gradinarov, 2000) та Швейцарії.

S. affine, зареєстрований у Німеччині (Poinar, 1990), Словаччині (Sturhan та Liskova, 1999), Словенії (Laznik *та ін.*, 2009), Чехії (Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Půža та Nermut', 2015), Болгарії (Shishiniova, Budurova та Gradinarov, 2000) та Швейцарії.

S. intermedium, виділена з Німеччини, Словаччини (Sturhan та Liskova, 1999), Чехії (Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Půža та Nermut', 2015), Болгарії (Shishiniova, Budurova та Gradinarov, 2000) та Швейцарії.

S. arenarium, знайдена у Воронежському та інших регіонах Центральної Росії (Іванова, Данилов та Івахненко, 2000; Artyukhovsky *та ін.*, 1997; Fischer-Le Saux *та ін.*, 1998; Poinar, 1990), Болгарії та Чехії (Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Půža та Nermut', 2015).

S. silvaticum та *S. weiseri*, знайдена у Німеччині (Sturhan, Spiridonov та Mráček, 2005) та Чехії (Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Mráček, Sturhan та Reid, 2003; Půža та Nermut', 2015).

Відомі поодинокі знахідки *S. bicornutum* та *H. zealmaica* з Чехії (Mráček, Kindlmann та Jerskov, 2005; Půža та Nermut', 2015) та Росії (Poinar, 1990) відповідно. *S. bicornutum* також було виділено з Болгарії (Shishiniova, Budurova та Gradinarov, 2000).

S. poinari, описаний з Чехії (Mracek, Půža та Nermut, 2014; Mráček, Půža та Nermut', 2014).

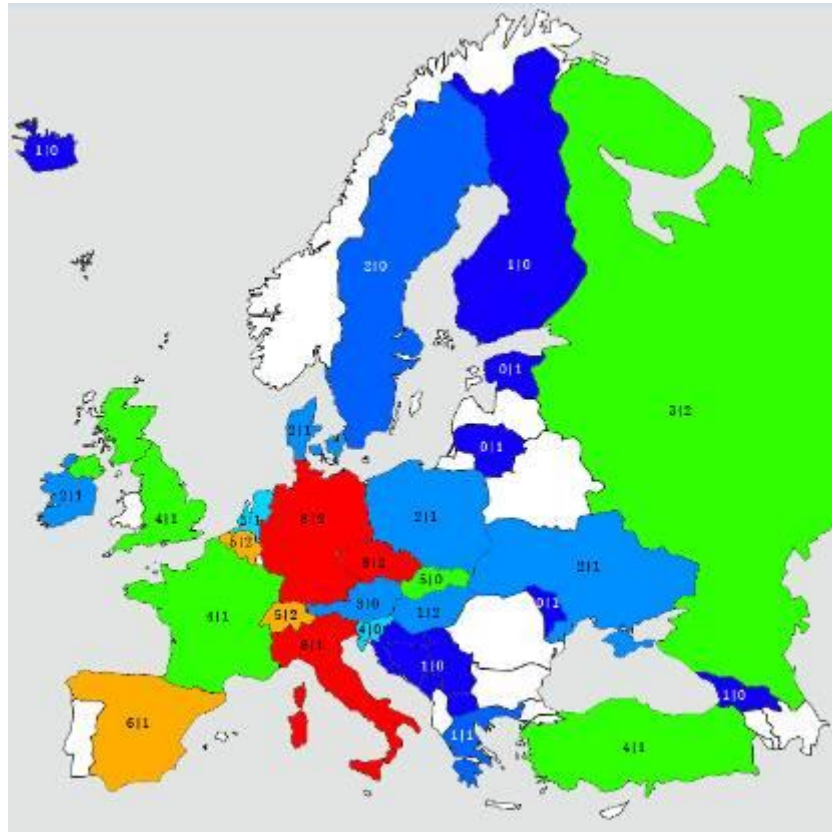


Рис. 4.15. Розподіл ЕПН по країнах Європи. Умовні позначення: кількість видів *Steinernema*|*Heterorhabditis*. (Оригінал).

Згідно з дослідженнями автора (Yakovlev, Kharchenko та Mráček, 2014), на території України представлено два види роду *Steinernema*.

При вивченні фауни ентомопатогенних нематод агроценозів України, Сігарьовою *та ін.* (2009) було проаналізовано 837 ґрунтових проб зібраних на території Київської, Вінницької, Миколаївської, Хмельницької, Сумської областей та АР Крим. З них, загалом, були заселені ентомопатогенними нематодами 11,5 % (96 проб) (Kharchenko *та ін.*, 2012).

Авторами було виявлено, що ентомопатогенні нематоди заселяють агрокультури нерівномірно (див. Таблицю 4.9). *H. bacteriophora* віддає перевагу садам, ягідникам та виноградникам. Представники роду *Steinernema* – польовим культурам та сосновим розплідникам.

Таблиця 4.9.

Заселеність ценозів різними видами ентомопатогенних нематод. Подано за (Kharchenko *та ін.*, 2012), в дужках – кількість проб.

Регіон, ценоз	Кількість проб				
	Відібраних	Заражених, %			
		Всього	<i>S. feltiae</i>	<i>S. carpocapsae</i>	<i>H. bacteriophora</i>
Україна					
Польові культури	171	25,0 (43)	20,0 (34)	5,0 (9)	0
Сади і ягідники	133	16,5 (22)	0	2,1 (3)	14,4 (19)
Соснові розплідники	40	10,0 (4)	0	5,0 (2)	5,0 (2)
Всього	344	20,1 (69)	9,9 (34)	4,1 (14)	6,0 (21)
АР Крим					
Сади	168	8,3 (14)	1,8 (3)	0	6,5 (11)
Виноградники	60	6,7 (4)	0	0	6,7 (4)
Декоративні культури	201	4,5 (9)	1,0 (2)	0	3,5 (7)
Польові культури	64	0	0	0	0
Всього	493	5,5 (27)	1,1 (5)	0	4,4 (22)

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). Це пояснюється його значною стійкістю до факторів середовища та невибагливістю у виборі хазяїв.

Ентомопатогенні нематоди цих двох родів відрізняються представленістю у ґрунті: види роду *Steinernema* переважають над видами роду *Heterorhabditis* (Edgington *та ін.*, 2010; Stock, Pryor та Kaya, 1999). Зазвичай, знахідки *Steinernema* переважають у лісових масивах (найчастіше – у дубняках), *Heterorhabditis* – у садах та культивованих полях (Stock *та ін.*, 2008; Stock, Strong та Gardner, 1996).

Різна представленість ЕПН у агроценозах та екосистемах з низьким антропогенним тиском дискутується: є приклади як активнішого заселення агроценозів (Mráček та 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).

4.3.3. Залежність поширення ентомопатогенних нематод від біотичних та абіотичних факторів

Поширення ЕПН безпосередньо пов'язане з типом ґрунту (Korpenhöfer та Fuzy, 2006), його рН, пористістю, вологістю, температурою (Cagnolo та Campos, 2008). Серед ентомопатогенних нематод є як мешканці винятково рівнинних та лучних ґрунтів, агроценозів (*S. feltiae*, *S. oregonense*), лісових біоценозів (*S. weiseri*, *S. monticolum*), так і невибагливі до типу рослинності (*S. kraussei*).

Встановлено, що ІЛ ЕПН здатні до руху в ґрунті з середньою швидкістю від 3,3 см/день до 7,5 см/день та максимальною швидкістю у 33,3 см/день, в залежності від його характеру (Jabbour та Barbercheck, 2008). Відомо, що інвазійні личинки ЕПН здатні також до сезонної вертикальної міграції в ґрунті (Susurluk, 2008). ЕПН обох родів відрізняються різною стійкістю до температури. Зокрема, ІЛ нематод з роду *Steinernema* протягом року знаходяться в верхньому шарі ґрунту (0-15 см від поверхні), в той час як личинки *Heterorhabditis* знаходяться в верхньому шарі ґрунту лише протягом липня–жовтня, в інші місяці вони проникають у глибокі рівні (15-50 см від поверхні). Дані висновки підтверджені дослідом з Y-подібною трубкою, наповненою піском, на одному кінці якої розміщували личинку *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Curculionidae) і зменшували температуру, інше відгалуження утримували за сталої

«теплої» температури; в основний отвір внесено вносили ІЛ *H. bacteriophora*, в результаті більша кількість ІЛ знайшли у «теплому» відгалуженні, в той час як менша кількість спрямувала свій рух до личинки жука, відповідно, орієнтуючись за концентрацією її метаболітів в ґрунті (аміак, вуглекислий газ) (Boff, Van Tol та Smits, 2002). Очікується (Jabbour та Barbercheck, 2008), що на рухливість та швидкість поширення нематод в ґрунті впливають не тільки тип, а також характер агрокультурного ландшафту (такі параметри як вологість ґрунту та щільність посадки рослин).

Рядом авторів встановлено, що ентомопатогенні нематоди є чутливими до знижених температур. Так, після зберігання при температурі 5 ± 1 °C, виживання інвазійних личинок нематод *S. rarum* штаму OLI знижується більше ніж на 60 %, їх здатність до зараження вже на 12 тижні зберігання знижується майже у два рази (Cagnolo та Campos, 2008), ці параметри для інвазійних личинок *Heterorhabditis* при зберіганні за температури 5 ± 2 °C так само знижуються (Jung, 1996).

Встановлено, що ефективність використання ЕПН залежить не тільки від доступності шляхів проникнення та товщини покривів хазяїна, а і від швидкості дії імунної системи комах, що полягає в повній або частковій інкапсуляції личинок нематод меланоцитами комах (Lackie, 1988).

Виявлено, що ЕПН здатні розпізнавати вміст травного тракту комах-хазяїв, що виявляється у зміні частоти та тривалості зупинок, руху вперед, рухів головним кінцем у сторони, пошукової активності при обробці нематод шлунковим вмістом різних видів комах, що корелює з патогенністю ІЛ різних видів ЕПН до цих комах. Виявлено, що нематоди з різних родів виявляють різний рівень чутливості (*Heterorhabditis* spp. більш чутливі, ніж *Steinernema* spp.) [57].

Різні види ентомопатогенних нематод демонструють різну здатність до зараження комах-хазяїв на певних стадіях розвитку, а саме личинок, лялечок і імаго (самці та самиці). На прикладі *Capnodis tenebrionis* (L., 1758), (Morton та García-del-Pino, 2009) доводять чутливість різних стадій розвитку даної тест-комахи до трьох видів ЕПН, представлених 14 ізолятами, а саме *S. feltiae*, *S. carpocapsae* та *H. bacteriophora*. На личинкових стадіях розвитку тест-комахи

ЕПН викликають 100 % смертність; відрізняється лише швидкість розвитку патологічного процесу. На стадії заляльковування, ІЛ ЕПН демонструють різну здатність до ураження лялечок тест-об'єкту: *S. feltiae* – 40 %, *S. carpocapsae* – 20 %, *H. bacteriophora* – 70 %. ІЛ *H. bacteriophora* викликає значне ураження лялечок оскільки використовує для проникнення через кутикулу лялечок проксимальний зуб (Bedding, Molyneux та Akhurst, 1983). Для імаго ІЛ ЕПН демонструють приблизно однаковий рівень зараження: *S. feltiae* – 33,3-83,3 % для самців та до 45,5 % для самиць, *S. carpocapsae* – 58,3 % для самців та 36,4 % для самиць, *H. bacteriophora* – 33,3-50,0 % для самців та до 9,1 % для самиць. Статева диференціація ураження комах залежить, скоріше за все, від будови генітального апарату, інтенсивності імунної відповіді, фізіологічних та етологічних відмінностей між статями одного виду (Morton та Garcia-del-Pino, 2013; Morton та García-del-Pino, 2009).

Експеримент із симульованими кореневими системами (Ennis, Dillon та Griffin, 2010) демонструє, що 69,2 % личинок *Hylobius abietis* (L., 1758), використаних для дослідження, заражаються личинками *S. carpocapsae*, якщо у симульованій моделі присутні елементи коренів *Picea sitchensis* (Bongard Carrière, 1855 та можливість харчуватися на них кормом для комах. У продовженні експерименту 48,3 % личинок *H. abietis* заражаються ІЛ в випадку наявності лише симульованої кореневої системи, в той час як контрольні зразки з відсутніми кормом та кореневою системою продемонстрували лише 25 % заражень.

У модифікованому досліді з Y-подібною трубкою, наповненою піском, було виявлено, що корені полуниці викликають сильну негативну реакцію з боку ІЛ *H. megidis*, що спричинює їх рух у протилежному кореням напрямку, але при наявності в трубці личинок *O. sulcatus* та коренів полуниці був досягнутий зворотній ефект та смертність комах на рівні 37 %. Даний ефект, скоріше за все, пов'язаний з пошкодженням комахами коренів рослин [31].

Дані результати демонструють, що ІЛ ЕПН асоційовані з кореневими системами рослин, оскільки: пересування вздовж коренів легше і швидше, ніж

пересування у капілярах між елементами ґрунту (Ennis, Dillon та Griffin, 2010); комахи, що живляться на кореневій системі рослини легше заражуються при харчуванні ІЛ нематод, які інвазуються таким чином через травну систему комахи; ІЛ, із стратегією активного пошуку орієнтуються на ранові гормони пошкоджених коренів, вібрації, що поширюються коренем та акустичні сигнали від комахи (Mankin *та ін.*, 2008; Torr, Heritage та Wilson, 2004).

Доведено можливість селективного відбору штамів ентомопатогенних нематод, здатних до атрактивної реакції на маркери пошкодження рослинних коренів комахами-шкідниками. Так, інвазійні личинки ЕПН (в даному досліді, ІЛ *H. bacteriophora*) здатні до вироблення більшої чутливості до (Е)- β -каріофіленів та β -фарнесенів, що виділяються у ґрунт пошкодженими коренями кукурудзи (Hiltpold *та ін.*, 2010).

На ефективність використання ЕПН значущо впливає паралельне використання пестицидів. Так, 2,4D, ацетохлор та оксіфлуорфен знижують життєздатність ІЛ *S. carpocapsae*, *S. glaseri*, *S. arenarium* та *H. bacteriophora* до 0-10 %. Загалом, хімічні пестициди, інсектициди та акарициди суттєво знижують життєздатність ІЛ або здатність до інфікування, в свою чергу штейнернеми та гетерорабдитиси виявляють різну чутливість до агрохімічних препаратів. Виявлено, що препарати на основі імідаклоприду, тіаметоксаму (інсектициди) та карбофураму (інсектицид/нематоцид) придатні до використання з ЕПН (Negrisoli, Barbosa та Moino, 2008).

На прикладі досліді з використанням різних типів ґрунту (супіски, піщані суглинки, глини, ілісті суглинки, підкислений пісок, суміш з високим вмістом органіки) (Korpenhöfer та Fuzy, 2006), попередньо пастеризованого, з експозицією личинок *Anomala orientalis* Waterhouse, 1875 та *Popillia japonica* Newman, 1841 третього віку з ІЛ ЕПН *S. scarabaei*, *S. glaseri*, *H. zealmaica*, та *H. bacteriophora* доведена залежність розміру інвазійних личинок, їх мобільності та стратегії пошуку хазяїв (Georgis та Poinar, 1983) від: розмірів пор ґрунту; розміру часток ґрунту, що впливають на кількість «неефективних» рухів личинок нематод на момент часу; рН ґрунту, через зміщення іонного складу водного розчину в

капілярах, що знижує ефективність пошуку хазяїв за допомогою хеморецепції; наявності та кількості органічного матеріалу в ґрунті. Для ІЛ *H. zealmaica* та *H. bacteriophora* в гуміфікованому ґрунті спостерігалася вища заражуваність, ніж для інших типів ґрунту (проте, в даному випадку, автори лише констатують явище без пояснення причин). Встановлено, що види роду *Steinernema* зберігаються в ґрунті довше за ІЛ *Heterorhabditis* ((Baur та Kaya, 2001) по (Korpenhöfer та Fuzy, 2006)). Моліне вказує також на вплив різних температур на мобільність та інвазійну здатність ІЛ ентомопатогенних нематод (Molyneux, 1986): інвазійні личинки різних родів та видів мають різну інвазійну здатність за однакових температур, що впливає на рухливість ІЛ, здатність до репродукції в уражених комах та характер проходження життєвого циклу (так, види роду *Heterorhabditis* майже втрачають здатність до зараження при температурах, нижчих за 9 °C, в той час, як *S. feltiae* заражає комах при температурі 2 °C). (Sriram та Lakshmi, 2001).

4.4. Вплив температурного фактору на мінливість ентомопатогенних нематод

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.

Умови проведення експерименту. Личинки *G. mellonella*, анестезовані ефіром та відмиті у 30 %-ному етиловому спирті, були обприскані суспензією інвазійних личинок ЕПН у концентрації 100 личинок на комаху.

Для експерименту були вибрані граничні температури культивування нематод у заражених комах. Після загибелі усіх комах, на другу добу після зараження, половина (5) з них була перенесена в стерильних індивідуальних камерах до термостату з температурою 28 °С, другу частину (5) утримували в стерильних індивідуальних камерах в темному місці за температури 18 °С. Камери захищалися від висихання шляхом змочування стерильним фізіологічним розчином.

В якості контролю для порівняння морфології та різниці у темпах перебігу життєвого циклу було використано культуру ЕПН того ж ізоляту, культивованого при 22 °С.

Загиблих комах розтинали по одній кожні 2 дні експерименту. Розтин проводили в стерильному фізіологічному розчині. Вміст комах суспензували у фізіологічному розчині та центрифугувалися при 1000 об/хв протягом 1 хв. з видаленням супернатанту два рази для видалення решток комах та продуктів бродіння. Нематоди фіксували нагрітим до 50-60 °С 70 % етиловим спиртом.

Отриманих нематод різних стадій розвитку підраховували. Виготовили постійні препарати для вимірювання морфометричних показників та вивчення деталей морфології.

В якості морфометричних критеріїв для оцінки зміни показників використано: L, W, ES, T, ABD (♀), CBD (♂), V та коефіцієнти: V %, a, b, c.

Для отримання інвазійних личинок останню пару комах утримували у камерах до евазії нематод.

Результати. Виявлено закономірні зміни у морфології та життєвих циклах ентомопатогенних нематод, в залежності від температури культивування.

Таблиця 4.10.

Морфометричні параметри різних генерацій ентомопатогенних нематод, отриманих за різних температур культивування (22 °C (зелений колір); 18 °C (блакитний колір); 28 °C (червоний колір)). Коефіцієнти виділено ніпівжирним шрифтом.

	♂I	♀I	♂II	♀II
n	10	10	10	8
	1323±114	4008±408	1188±76	2511±437
L	(1195-1545)	(3185-4725)	(1050-1285)	(1910-3040)
W	83±9 (70-100)	197±26 (160-235)	67±3 (60-70)	128±22 (100-170)
ES	137±10 (125-155)	183±10 (170-200)	126±16 (110-155)	173±10 (155-190)
T	36±4 (30-40)	47±5 (40-55)	31±2 (28-35)	47±6 (40-55)
ABD (♀,J2d); CBD (♂)	44±5 (35-50)	69±8 (60-80)	42±3 (35-45)	49±6 (40-55)
		2104±201		1357±192
V	-	(1750-2475)	-	(1065-1605)
V %	-	52±2 (48-55)	-	54±2 (49-56)
a	16±1 (14-18)	20±2 (18-24)	18±1 (16-20)	20±3 (18-26)

Продовження таблиці 4.10

	♂I	♀I	♂II	♀II
b	10±1	22±2	10±1	15±2
	(8-11)	(18-24)	(7-11)	(11-18)
c	38±4	87±15	39±3	54±6
	(34-47)	(70-118)	(33-43)	(44-62)
n	10	10	10	10
L	1088±78 (970-1198)	2911±189 (2653-3297)	1234±124 (1129-1564)	2116±193 (1931-2564)
W	75±4 (68-80)	172±7 (165-185)	79±7 (73-98)	115±9 (105-138)
ES	140±11 (125-153)	184±11 (160-195)	165±11 (140-175)	203±11 (190-220)
T	29±3 (25-35)	47±7 (35-60)	33±4 (28-40)	62±5 (55-73)
ABD (♀,J2d); CBD (♂)	42±2 (40-45)	66±8 (50-80)	41±4 (35-45)	42±3 (38-48)
V	-	1564±104 (1436-1752)	-	1153±128 (1059-1406)
V %	-	54±1 (51-55)	-	56±2 (54-61)
a	15±1 (40-45)	17±1 (16-18)	16±1 (15-17)	19±2 (14-23)
b	8±1 (7-9)	16±1 (14-18)	8±1 (7-11)	10±1 (9-12)

Продовження таблиці 4.10

	♂I	♀I	♂II	♀II
c	37±4 (34-47)	63±10 (48-81)	38±4 (31-45)	34±2 (31-37)
n	10	10	9	10
L	1364±208 (1155-1735)	6398±1009 (4683-8390)	1264±186 (950-1540)	3795±789 (2760-5292)
W	92±12 (70-105)	293±24 (267-327)	87±14 (65-110)	156±24 (125-196)
ES	141±15 (110-155)	203±15 (183-228)	139±15 (105-155)	168±16 (152-200)
T	33±4 (30-40)	55±8 (43-70)	32±3 (25-35)	65±14 (45-97)
ABD (♀, J2d); CBD (♂)	46±3 (40-50)	84±9 (68-93)	44±5 (35-50)	63±12 (48-85)
V	-	3384±415 (2574-3980)	-	1976±383 (1482-2759)
V %	-	53±3 (47-57)	-	52±1 (50-54)
a	15±2 (13-17)	22±4 (17-28)	15±2 (13-17)	24±2 (22-27)
b	9±2 (6-12)	32±6 (24-46)	9±1 (7-10)	23±5 (18-32)
c	42±8 (29-58)	117±20 (83-153)	39±5 (34-50)	60±11 (40-80)

На зміну температури культивування, ентомопатогенні нематоди відповідають змінами усіх морфометричних параметрів (Таблиця 4.10). 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 із збільшенням температури культивування (від 18 °C до 28 °C). Найбільшою мінливістю у морфометричних параметрах відрізняються самиці ентомопатогенних нематод.

Наведений вище канонічний аналіз візуалізовано графічно (Рис. 4.16-4.19).

У самиць ЕПН стабільним коефіцієнтом є V %, який лежить у межах 52-56 %.

Зміни у морфології на прикладі основних коефіцієнтів візуалізовано на Рис. 4.20 в кінці розділу.

Проведено аналіз дискримінантних функцій та канонічний аналіз з використанням промірів дорослих стадій розвитку ЕПН (Таблиці 4.11-4.18).

Таблиця 4.11.

Узагальнені результати аналізу дискримінантних функцій для самців I генерації.

Загальна Лямбда Вілкса: 0,256, $p < 0,000$.

	Wilks' - Lambda	Partial - Lambda	F-remove - (2,22)	p-level	Toler.	1-Toler. - (R-Sqr.)
L	0,296	0,866	1,703	0,205	0,558	0,442
W	0,309	0,830	2,260	0,128	0,606	0,394
ES	0,269	0,951	0,568	0,575	0,881	0,119
T	0,405	0,632	6,394	0,006	0,677	0,323
CBD	0,311	0,823	2,366	0,117	0,605	0,395

Таблиця 4.12.

Результати аналізу по Хі-квадрат для самців I генерації.

	Eigen- value	Canoncl - R	Wilks' - Lambda	Chi- Sqr.	df	p-level
0	1,707	0,794	0,256	32,707	10	0,000
1	0,443	0,554	0,693	8,805	4	0,066

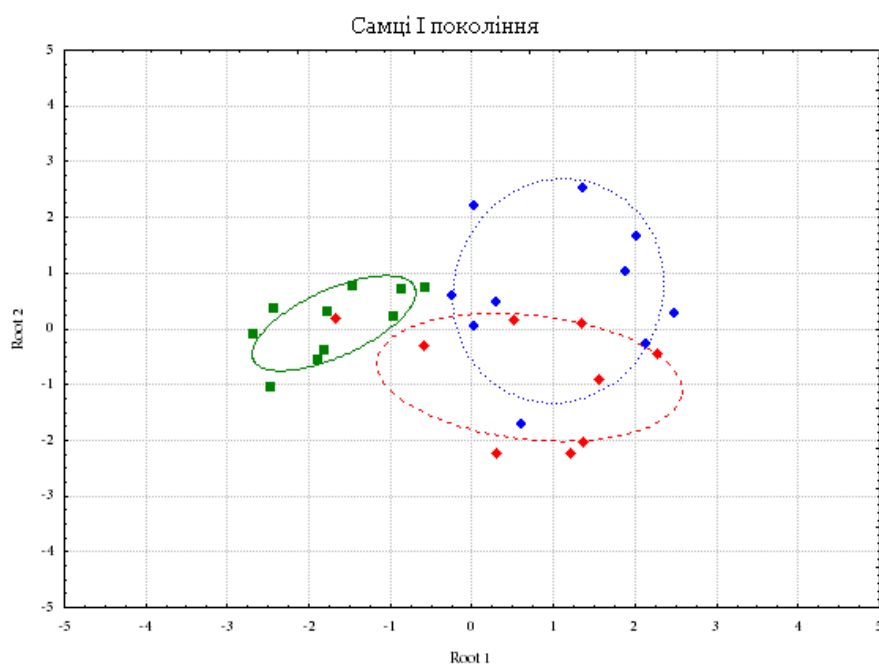


Рис. 4.16. Графіки аналізу канонічних змінних для самців I генерації. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95). Зеленим кольором позначено групу нематод, яку культивували при 22 °С, синім - 18 °С, червоним - 28 °С.

Самці I покоління мають вірогідне нерозходження ознак тільки за показником “Т”. Лямбда Вілкса наближається до 1,00, що вказує на схожість самців I генерації. Було виділено лише два канонічні корені, за якими побудовано графік порівняння.

Таблиця 4.13.

Узагальнені результати аналізу дискримінантних функцій для самців II генерації.

Загальна Лямбда Вількса: 0,133, $p < 0,000$.

	Wilks' - Lambda	Partial - Lambda	F-remove - (2,23)	p-level	Toler.	1-Toler. - (R-Sqr.)
L	0,175	0,759	3,649	0,042	0,378	0,622
W	0,294	0,452	13,940	0,000	0,364	0,636
ES	0,321	0,414	16,302	0,000	0,842	0,158
T	0,136	0,977	0,275	0,762	0,670	0,330
CBD	0,175	0,759	3,654	0,042	0,662	0,338

Таблиця 4.14.

Результати аналізу по Хі-квадрат для самців II генерації.

	Eigen- - value	Canoncl - R	Wilks' - Lambda	Chi-Sqr.	df	p-level
0	2,716	0,855	0,133	50,447	10	0,000
1	1,024	0,711	0,494	17,630	4	0,001

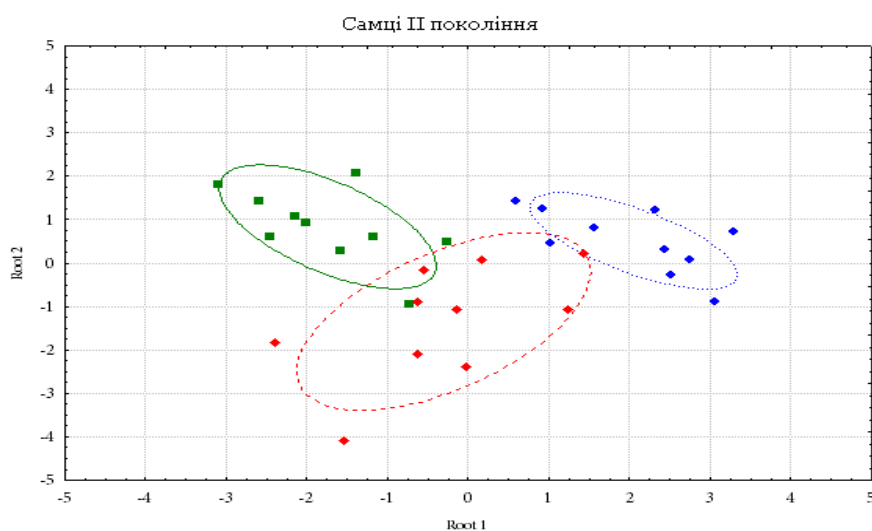


Рис. 4.17. Графіки аналізу канонічних змінних для самців II генерації. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95). Зеленим кольором позначено групу нематод, яку культивували при 22 °С, синім - 18 °С, червоним - 28 °С.

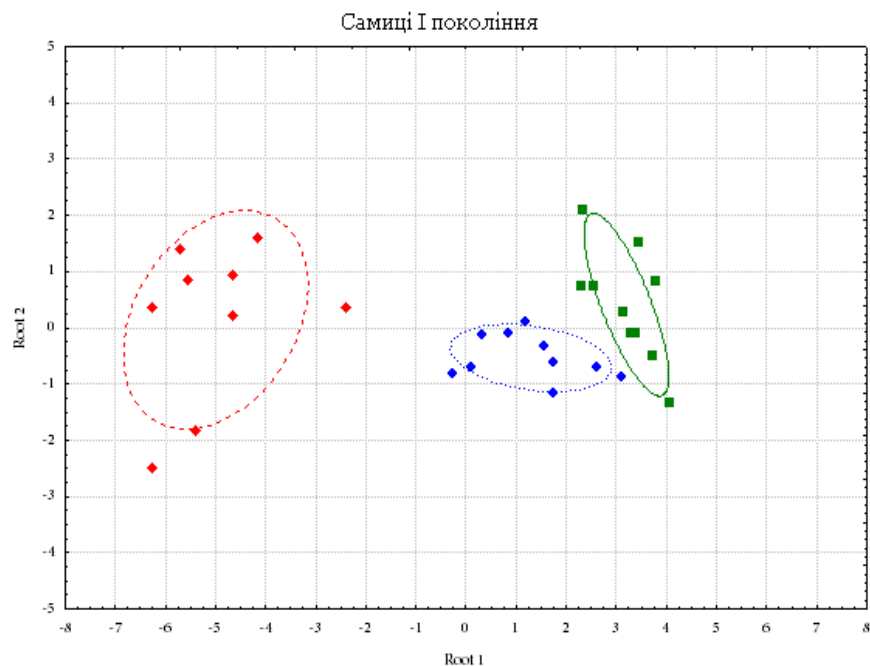


Рис. 4.18. Графіки аналізу канонічних змінних для самиць І генерації. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95). Зеленим кольором позначено групу нематод, яку культивували при 22 °С, синім - 18 °С, червоним - 28 °С.

Самці ІІ покоління мають вірогідно низький рівень подібності за морфометричними параметрами, крім “Т”. Було виділено лише два канонічні корені, за якими побудовано графік порівняння.

Таблиця 4.15.

Узагальнені результати аналізу дискримінантних функцій для самиць І генерації.

Загальна Лямбда Вілкса: 0,060, $p < 0,000$.

	Wilks' - Lambda	Partial - Lambda	F-remove - (2,21)	p-level	Toler.	1-Toler. - (R-Sqr.)
L	0,063	0,938	0,697	0,509	0,111	0,889
W	0,092	0,649	5,671	0,011	0,708	0,292
ES	0,062	0,965	0,379	0,689	0,844	0,156
T	0,064	0,927	0,821	0,453	0,483	0,517
ABD	0,060	0,993	0,079	0,924	0,519	0,480
V	0,070	0,845	1,932	0,170	0,104	0,896

Самиці І покоління мають вірогідно низьку подібність по параметру “W”. Програмою було виділено лише два канонічні корені, за якими побудовано графік порівняння.

Таблиця 4.16.

Результати аналізу по Хі-квадрат для самиць І генерації.

	Eigen-value	- Canonicl - R	Wilks' Lambda	- Chi-Sqr.	df	p-level
0	13,225	0,964	0,059	66,327	12	0,000
1	0,182	0,393	0,846	3,935	5	0,559

Таблиця 4.17.

Узагальнені результати аналізу дискримінантних функцій для самиць ІІ генерації.

Загальна Лямбда Вілкса: 0,074, $p < 0,000$.

	Wilks' - Lambda	Partial - Lambda	F-remove - (2,20)	p-level	Toler.	1-Toler. - (R-Sqr.)
L	0,078	0,953	0,498	0,615	0,021	0,979
W	0,079	0,941	0,628	0,544	0,247	0,753
ES	0,113	0,657	5,218	0,015	0,420	0,580
T	0,114	0,647	5,446	0,013	0,237	0,763
ABD	0,094	0,792	2,631	0,097	0,315	0,685
V	0,079	0,935	0,698	0,509	0,021	0,979

Таблиця 4.18.

Результати аналізу по Хі-квадрат для самиць II генерації.

	Eigen- value	- Canonicl - R	Wilks' Lambda	- Chi- Sqr.	df	p-level
0	5,300	0,917	0,074	58,545	12	0,000
1	1,141	0,730	0,467	17,131	5	0,004

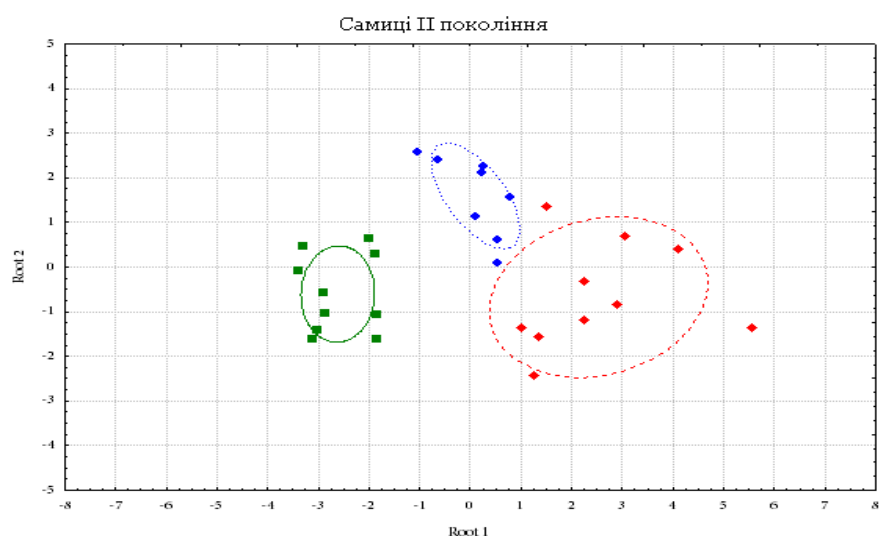


Рис. 4.19. Графіки аналізу канонічних змінних для самиць II генерації. Границі груп обведені еліпсами (межі 0,95). Зеленим кольором позначено групу нематод, яку культивували при 22 °С, синім - 18 °С, червоним - 28 °С.

Самиці II генерації мають вірогідно знижену подібність по показникам “ES” та “Т”. Програмою було виділено лише два канонічні корені, за якими побудовано графік порівняння.

Згідно з графіками аналізу канонічних змінних, певною морфологічною подібністю відрізняються лише самці першого покоління, в подальшому спостерігається розходження ознак. Найбільшою морфологічною мінливістю відрізняються самці та самиці, що утримувалися при високій температурі (дисперсія функцій відрізняється більшими діаметрами еліпсів границь груп). Вихідна група функцій (22 °С), як правило, значно відрізняється від групи 28 °С.

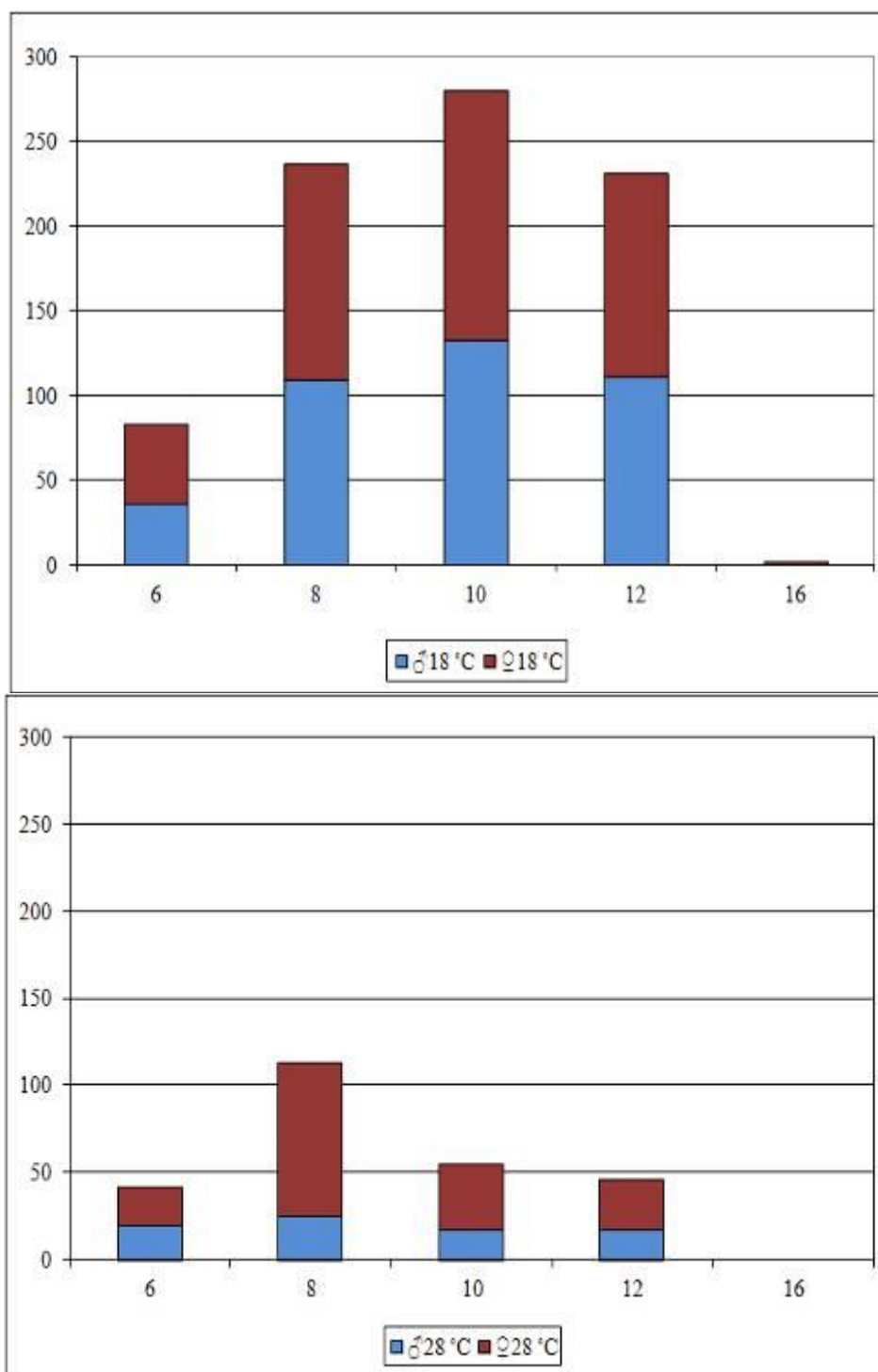


Рис. 4.20. Коливання загальної кількості самців та самиць по етапах експерименту. По вісі X позначені дні експерименту.

Помічено зміни в швидкості розвитку життєвих циклів ентомопатогенних нематод при різних температурах. Для ілюстрування даних змін, використано коефіцієнти: $\frac{\text{♂I}}{\text{♀I}}$, $\frac{\text{♂II}}{\text{♀II}}$, $\frac{\text{♂}}{\text{♀}}$ (Рис. 4.20-4.21). Характерним для обох життєвих циклів є відмирання самців I генерації до 8-го дня експерименту. При температурі 18 °C самці II генерації з'являються раніше, ніж самиці, збільшуючи коефіцієнт

♂II/♀II до 10,9, який в подальшому обвалюється до 0,9 та стабілізується. У самиць I генерації (28 °C) вже на 5 день експерименту спостерігається *endotokia matricida*, у самиць, при температурі 18 °C лише на 8 день починається розвиток личинок I віку у статевих органах. При температурі 18 °C на 16 день у залишках комах спостерігали дві живі самиці II генерації. Коефіцієнти ♂II/♀II, ♂/♀ при температурі 28 °C майже вдвічі нижчі, ніж при 18 °C.

Повний строк життєвого циклу (за кінець якого приймається евазія dauer-личинок) при температурі 18 °C склав 16 днів, при температурі 28 °C, - 14 днів. Вихід дауер-личинок склав: при температурі 18 °C ≈ 15300 личинок; при температурі 28 °C ≈ 9400 личинок.

Зміни морфології в залежності від температури культивування. Зміни у морфології дорослих особин ентомопатогенних нематод можна пов'язати зі зміною інтенсивності живлення нематод в процесі росту окремих особин та розвитку мікропопуляції.

Так, при пониженні температури культивування відносно температури культивування контролю спостерігається подовження життєвого циклу та, незважаючи на зниження інтенсивності росту, зростання індивідуальних мас нематод, оскільки нематоди живляться на субстраті довший час вони мають більше часу на індивідуальний розвиток особин.

При збільшенні температури культивування, у нематод зростає інтенсивність індивідуального росту та використання ресурсу, внаслідок чого зменшується кількість особин у мікропопуляції та скорочується термін життєвого циклу.

Подібні результати були отримані Хазір та ін. (Hazir та ін., 2001) для інвазійних личинок ентомопатогенних нематод при культивуванні при низькій температурі.

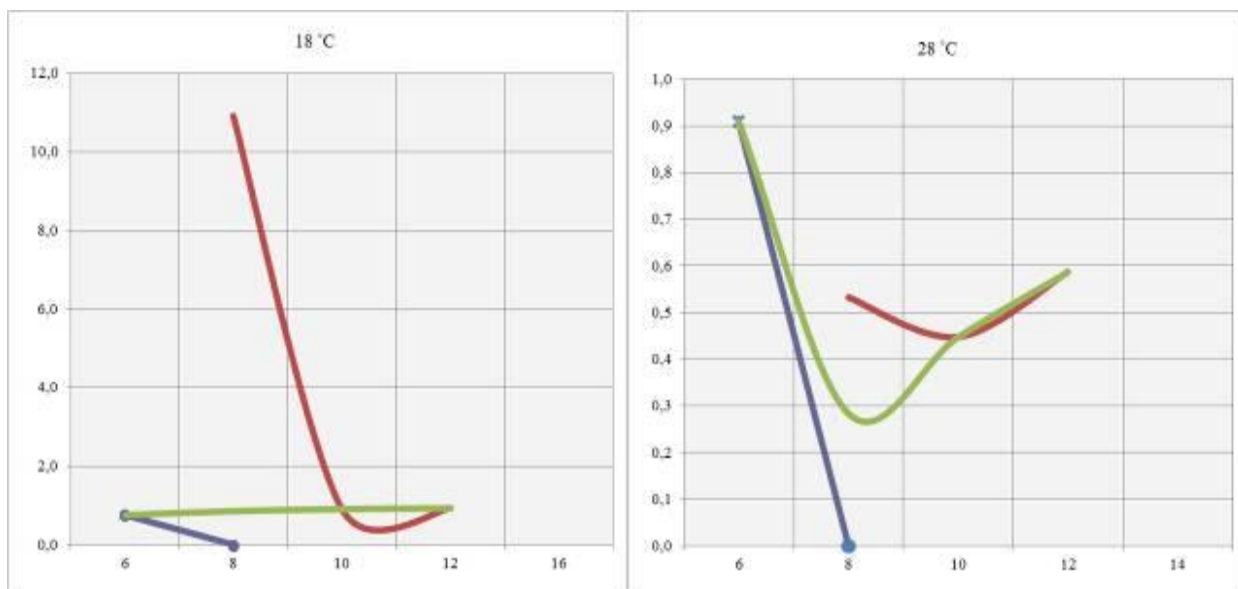


Рис. 4.21. Порівняння співвідношення самців та самиць різних генерацій впродовж експерименту. Умовні позначення: синя лінія – ♂I/♀I; пурпурова лінія – ♂II/♀II; зелена лінія – ♂/♀; по вісі X позначені дні експерименту.

У іншій таксономічній групі гельмінтів (*Alaria alata* (Goeze, 1782); Trematoda) відомий подібний ефект, пов'язаний з чисельністю мікропопуляції гельмінтів, інтенсивністю живлення на субстраті та імунною системою хазяїна (Шалдыбин, 1957).

4.5. «Пігмейні» особини

При дослідженні морфології виділених ізолятів ентомопатогенних нематод отримано так звані «пігмейні» особини (“pygmy” adults (Mráček, Sturhan та Reid, 2003; Yu *та ін.*, 2008)) самців та самиць різних генерацій.

В літературі відомі знахідки таких особин та відповідних ним вкорочених dauer-личинок для видів ЕПН: *S. cubana*, *S. feltiae*, *S. weiseri*, *S. carpocapsae* (Gouge та Hague, 1995; Yu *та ін.*, 2008).

«Пігмейні» форми відрізняються скороченими розмірними характеристиками, аномаліями линьки (Рис. 4.22), зовнішнього статевого апарату, проте вони здатні до розмноження.



Рис. 4.22. Морфологічні особливості «пігмейних» самиць I генерації ізоляту *S. arenarium* СН. А, Б, В – культивовані при 28 °С; Г, Д – культивовані при 18 °С. А, Г – загальний вигляд; Б, Д – головні кінці нематод; В – область вульви самиці. Цифрами позначено: 1 – аномалія розвитку хвостового кінця; 2 – личинка I віку в статевій системі самиці; 3 – аномальні губи вульви. Масштаб 100 мкм.

Особини з аномаліями розвитку виявлено в природних мікропопуляціях лише в ізолятах *S. feltiae* Ask-6-2 та Ask-12. Їх морфометричні показники надані у таблиці **Таблиці 4.19**.

Таблиця 4.19.

Морфометричні параметри «пігмейних» самиць ізолятів ентомопатогенних нематод *S. feltiae*.

Параметр	n	L	W	EP	NR	ES
Ask-6-2	10	1983±337	187±26		108±10	177±15
		(1565-2745)	(158-230)	129±9 (113-140)	(95-120)	(148-198)
Ask-12	8	1547±237	149±23		93±16	145±16
		(1195-1820)	(120-190)	89±15 (73-110)	(75-120)	(130-180)

Параметр	n	T	ABD	V	V %	D %
Ask-6-2	10			1054±171		
		21±11 (10-38)	72±18 (48-100)	(883-1400)	53±4 (49-59)	72±5 (64-83)
Ask-12	8				52±2	
		36±9 (20-45)	55±9 (45-70)	806±119 (610-920)	(49-56)	65±12 (52-79)

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 I генерації спостерігалась *endotokia matricida* (рис. 4.22), самиці II генерації були здатні до відкладання яєць.

При розвитку при температурі 28 °С характер морфологічних змін більш виражений, аніж при 18 °С (див. рис. 4.23). Більшість морфометричних параметрів «пігмейних» самиць I генерації, культивованих при 28 °С, не підлягає обліку внаслідок формування кутикулярних «шлейфів» та глибокого розташування основних структур.

Питання походження та знахідок пігмейних особин ЕПН активно дискутується у літературі. Відомі експериментальні дані щодо отримання пігмейних dauer-личинок (Yu *та ін.*, 2008). Автори досліджень пов'язують появу пігмейних личинок з пристосуванням нематод до розмірів комах-хазяїв та їх придатності в якості субстрату. Поява пігмейних самиць та інвазійних личинок реєструвалася у *S. feltiae* при культивуванні на різних видах термітів (Yu, Gouge та Baker, 2006; Yu *та ін.*, 2008). Для видів *S. weiseri* та *S. cubana* також відомі пігмейні форми дорослих особин (Mráček, Sturhan та Reid, 2003; Yu *та ін.*, 2008).

У даній роботі та публікаціях на тему дисертації (Yakovlev та Kharchenko, 2015) відмічено випадки появи пігмейних особин у культурі ентомопатогенних нематод з природних умов (ізоляти *S. feltiae* Ask-6-2 та Ask-12) та отриманих у результаті експерименту з морфологічної мінливості ізоляту *S. arenarium* СН залежно від температури культивування.

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 сумарно 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 (кутикулярні «шлейфи», рис. 4.22).

Поява пігмейних особин у нативних культурах не пов'язана безпосередньо зі зміною умов культивування, оскільки культури ізоляту Ask отримано за кімнатної температури (20-22 °C), що незначно відрізняється від початкових умов збору ґрунтових проб (Таблиця 2.1). Можливе пояснення полягає у зміні комах-хазяїна, оскільки природна спеціалізація даних ізолятів невідома і поява пігмейних особин може говорити про пристосування до живлення на новому субстраті (личинки *G. mellonella*).

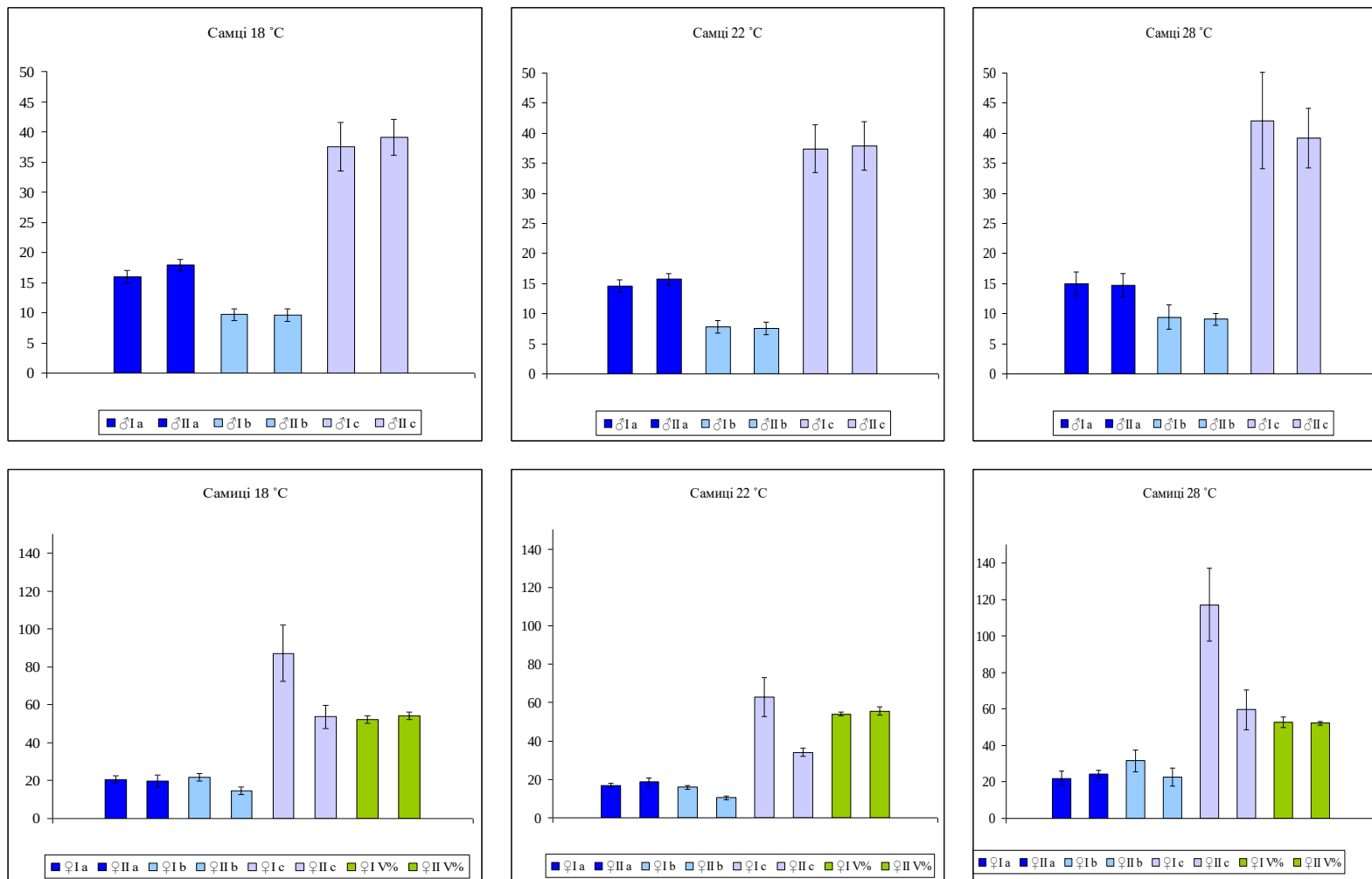


Рис. 4.23. Порівняння зміни коефіцієнтів a, b, c, V% дорослих гельмінтів в залежності від температури культивування.

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 комахи, 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 ЛІТЕРАТУРИ

1. Веденьков, Є. П., Водоп'янова, В. Г. 1974. Флора заповідного степу "Асканія-Нова". У: Курдюк, М. Г., Карасьов, Г. М., Веденьков, Є. П., Дубина, Б. В., Дрегович, Н. Ю. (ред.-ри.) *Рослинні багатства заповідного степу і ботанічного парку "Асканія-Нова". Каталог*. Київ: "Наукова думка", 11-58.
2. Веремчук, Г. В. 1969. Новый вид энтомопатогенных нематод рода *Neoaplectana* (Rhabditida: Steinernematidae). *Паразитология*, 3, 249-252.
3. Веремчук, Г. В. 1972. О массовом разведении энтомопатогенного нематодно-бактериального комплекса. *Паразитология*, VI, 376-380.
4. Веремчук, Г. В. 1974. О некоторых факторах, влияющих на заражение насекомых нематодами *Neoaplectana carpocapsae agriotos* (Nematoda: Steinernematidae). *Паразитология*, VIII, 402-407.
5. Данилов, Л. Г. 2005. Особенности экологии и распространения энтомопатогенных нематод в различных экосистемах. *Вестник защиты растений*, 1, 18-26.
6. Дрегваль, О. А., Черевач, Н. В., Тимчук, О. А., Вінніков, А. І. 2008. Використання ентомопатогенних мікроорганізмів для захисту лісопаркових та садових насаджень від американського білого метелика. *Екологія та ноосферологія*, 19, 194-198.
7. Иванова, Т. С., Данилов, Л. Г., Ивахненко, О. А. 2000. Распространение энтомопатогенных нематод семейств Steinernematidae и Heterorhabditidae в России и их морфологическая характеристика. *Parasitologiya*, 34, 323-334.
8. Кирьянова, Е. С., Пучкова, Л. В. 1955. Новый паразит свекловичного долгоносика *Neoaplectana bothynoderi* Kirjanova et Putschkova, sp. n. (Nematodes). *Труды зоологического института Академии Наук СССР*, 18, 53-62.
9. Климов, С. А., Кочетков, В. В., Щетинина, М. М., Спиридонов, С. Э. Выделение в московском регионе, определение и биологическое тестирование новых культур почвенных энтомопатогенных нематод. Теоретические и

практические проблемы паразитологии, 30 ноября – 3 декабря 2010 Москва. Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 166-170.

10. Лисенко, Г. М. 2008. Моніторинг фітосистем заповідного степу "Кам'яні могили". *Чорноморський ботанічний журнал*, 4, 89-97.

11. Маринич, А. М., Пашенко, В. М., Шищенко, П. Г. 1985. *Природа Украинской ССР. Ландшафты и физико-географическое районирование*, Киев, Наукова Думка.

12. Марчук, І. У., Савчук, А. В. 2008. *Методика відбору ґрунтових зразків для агрохімічного аналізу*, Київ, ДП «Агроцентр ЄвроХім-Україна».

13. Олененко, В. В., Сигарёва, Д. Д. 2009. Количество генераций энтомопатогенных нематод *Steinernema feltia* и *Heterorhabditis bacteriophora* при культивировании на гусеницах. *Информационный бюллетень Международной организации по биологической борьбе с вредными животными и растениями*, 39, 162-166.

14. Рубцов, И. А. 1978. *Мермитиды. Классификация, значение, использование*, Ленинград, "Наука".

15. Самсонова, М. В., Косевич, И. А., Спиридонов, С. Э. Новые культуры энтомопатогенных нематод из региона Северного Кавказа: определение по морфологическим и молекулярно-таксономическим признакам. Теоретические и практические проблемы паразитологии, 30 ноября – 3 декабря 2010 Москва. Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 334-337.

16. Сигарёва, Д. Д., Олененко, В. В. Количество генераций *Heterorhabditis bacteriophora* при заражении гусениц *Galleria mellonella* L. единичными инвазионными личинками. Паразитарные болезни человека, животных и растений: тр. VI Международной научно-практической конференции, 2008 Витебск. Витебский государственный медицинский университет, 287-289.

17. Сігарьова, Д. Д., Олененко, В. В., Граціанова, Н. В., Яковлев, Є. Б. 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. 2009 Ужгород. 103.

18. Стефановська, Т. Р. 2007. Ефективність розмноження ентомопатогенних нематод *Steinernema carpocapsae* та *Heterorhabditis bacteriophora* на личинках *Galleria melonella* L. та *Tenebrio molitor* L. “Наукові доповіді НАУ” [Online], 2. Available: <http://www.nbu.gov.ua/e-Journals/nd/2007-2/07stratm.pdf>.

19. Шалдыбин, Л. С. 1957. Паразитические черви волков Мордовской АССР. Учёные записки Горьковского государственного педагогического института им. М. Горького, XIX, 65-70.

20. Яковлев, Є. Б., Олененко, В. В. 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.

21. Adams, B. J., Peat, S. M., Dillman, A. R. 2007. Phylogeny та evolution. In: Nguyen, K. B., Hunt, D. J. (eds.) *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny та Bacterial Symbionts*. Leiden-Boston: Brill.

22. Amarasinghe, L. D., Hominick, W. M., Briscoe, B. R., Reid, A. P. 1994. Occurrence та distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. *Journal of Helminthology*, 68, 277-286.

23. Taaló, V., Moino, A., Jr., Santa-Cecília, L. V. C. 2004. Compatibilidade de Nematóides Entomopatogênicos com Produtos Fitossanitários Utilizados na Cultura do Cafeeiro. *Nematologia Brasileira*, 28, 149-158.

24. Artyukhovsky, A. K., Kozodoi, E. M., Reid, A. P., Spiridonov, S. E. 1997. Redescription of *Steinernema arenarium* (Artyukhovsky, 1967) topotypes from Central Russia та a proposal for *S. anomale* (Kozodoi, 1984) as a junior synonym. *Russian Journal of Nematology*, 5, 31-37.

25. Baur, M. E., Kaya, H. K. 2001. Persistence of entomopathogenic nematodes. In: Baur, M. E., Fuxa, J. R. (eds.) *Factors affecting the survival of entomopathogens*. Southern Cooperative Series Bulletin.
26. Bedding, R. A., Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21, 109-110.
27. Bedding, R. A., Molyneux, A. S., Akhurst, R. J. 1983. *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp., та *Steinernema kraussei*: Interspecific та Intraspecific Differences in Infectivity for Insects. *Experimental Parasitology*, 55, 249-257.
28. Benson, D. A., M, C., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Sayers, E. W. 2014. GenBank. *Nucleic Acids Research*, D32-37.
29. Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liuk, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., Thomas, W. K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71-75.
30. Boff, M. I. C., Van Tol, R. H. W. M., Smits, P. H. 2002. Behavioural response of *Heterorhabditis megidis* towards plant roots та insect larvae. *Biological Control*, 47, 67-83.
31. Boff, M. I. C., Zoon, F. C., Smits, P. H. 2001. Orientation of *Heterorhabditis megidis* to insect hosts та plant roots in a Y-tube та olfactometer. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98, 329-337.
32. Bovien, P. 1937. Some type of association between nematodes та insects. *Videnskabelige Meddelelser Dansk Naturhistorisk Forening*, 101, 1-114.
33. Burnell, A. M., Stock, S. P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* та their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2, 31-42.
34. Cagnolo, S., Campos, V. 2008. Effect of storage temperature on survival та infectivity of *Steinernema rarum* (OLI strain) (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 114-115. doi: 10.1016/j.jip.2008.02.013.
35. Campbell, J. F., Lewis, E. E., Stock, S. P., Nadler, S., Kaya, H. K. 2003. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 35, 142-145.

36. Chitwood, B. G., Chitwood, M. B. H. 1937. *An introduction to nematology*, Baltimore, Md., Monumental printing co.
37. Ciche, T. A., Darby, C., Ehlers, R.-U., Forst, S., Goodrich-Blair, H. 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biological Control*, 38, 22-46. doi: 10.1016/j.biocontrol.2005.11.016.
38. Curran, J. 1989. Chromosome numbers of *Steinernema* and *Heterorhabditis* species. *Revue de Nematology*, 12, 145-148.
39. De Man, J. G. 1876. Onderzoekingen over vrij in de aarde levende nematoden. *Nederlmasch Tijdschrift voor de Dierkunde*, 2, 78-196.
40. De Man, J. G. 1880. Die Eingheimischen, frei in der reinen erde und im süßen wasser lebends Nematoden. *Nederlmasch Tijdschrift voor de Dierkunde*, 5, 1-104.
41. Dnabaser 2014a. Chromatogram Explorer v.3.3.0. *Heracle Biosoft SRL*.
42. Dnabaser 2014b. DNA Baser Sequence Assembler v.4.16.0. *Heracle Biosoft SRL*.
43. Dutky, S. R., Hough, W. S. 1955. Note on a parasitic nematode from Codling moth larvae (*Carpocapsa pomonella*) (Lepidoptera, Olethreutidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 57, 24.
44. Edgington, S., Hunt, D., Moore, D., France, A., Merino, L., Buddie, A., Tymo, L. 2010. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. *Nematology*, 12, 915-928. doi: 10.1163/138855410x498897.
45. Ehlers, R.-U., Deseo, K. V., Stackebrandt, E. 1991. Identification of *Steinernema* spp. (Nematoda) and their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. from Italian and German soils. *Nematologica*, 37, 360-366.
46. Ehlers, R. U., Shapiro-Ilan, D. I. 2005. Mass Production. In: Grewal, P. S., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D. I. (eds.) *Nematodes as Biocontrol Agents*. Wallingford: CABI Publishing. 65-78.
47. Ennis, D. E., Dillon, A. B., Griffin, C. T. 2010. Simulated roots and host feeding enhance infection of subterranean insects by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 140-143.

48. Filipjev, I. N. 1934. *Miscellanea Nematologica*. 1. Eine neue Art der Gattung *Neoaplectana* Steiner nebst Bemerkungen fiber die systematische Stellung der letzteren. . *Parasitologicheskii Sbornik, Edition of the Zoological Institute of the USSR Academy of Sciences.*, 4, 229-240.
49. Fischer-Le Saux, M., Mauleon, H., Constant, P., Brunel, B., Boemare, N. 1998. PCR-ribotyping of *Xenorhabdus* та *Photorhabdus* isolates from the Caribbean region in relation to the taxonomy та geografic distribution of their nematode hosts. *Applied ma Environmental Microbiology*, 64, 4246-4254.
50. Gaugler, R. 2002. *Entomopathogenic nematology*, Wallingford, CABI.
51. George O. Poinar, J. 1988. Redescription of *Neoaplectana affinis* Bovien (Rhabditida: Steinernematidae). *Revue de Nematology*, 11, 143-147.
52. Georgis, R., Koppenhofer, A. M., Lacey, L. A., Belair, G., Duncan, L. W., Grewal, P. S., Samish, M., Tan, L., Torr, P., Van Tol, R. W. H. M. 2006. Successes та failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control*, 38, 103-123.
53. Georgis, R., Poinar, G. O., Jr. 1983. Vertical migration of *Heterorhabditis bacteriophora* та *H. heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) in stay loam soil. *Journal of Nematology*, 15, 652-654.
54. Gouge, D. H., Hague, N. G. M. 1995. The development of *Steinernema feltiae* (Nematoda Steinernematidae) in the sciarid fly *Bradysia paupera* (Diptera: Sciaridae). *Annals of Applied Biology*, 126, 395-401. doi: 10.1111/j.1744-7348.1995.tb05374.x.
55. Gradinarov, D., Petrova, E., Mutaфchiev, Y., Karadjova, O. 2012. Distribution of Entomopathogenic Nematodes of the Genus *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) in Bulgaria. *Nematologia Mediterranea*, 40, 173-180.
56. Gradinarov, D., Petrova, E., Waeyenberge, L., Karadjova, O. 2011. First Report of the Enthomopathogenic Nematode *Steinernema arenarium* (Steinernematidae: Rhabditida) in Bulgaria. *Nematologia Mediterranea*, 39, 47-52.

57. Grewal, P. S., Gaugler, R., Lewis, E. E. 1993. Host Recognition Behavior by Entomopathogenic Nematodes during Contact with Insect Gut Contents. *Journal of parasitology*, 79, 495-503.
58. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
59. Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., Keskün, N. 2003. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turkey Journal of Biology*, 27, 181-202.
60. Hazir, S., Stock, S. P., Kaya, H. K., Koppenhöfer, A. M., Keskin, N. 2001. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 77, 243-250. doi: 10.1006/jipa.2001.5029.
61. Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Turlings, T. C. J. 2010. How maize root volatiles affect the efficacy of entomopathogenic nematodes in controlling the western corn rootworm? *Chemoecology*, 20, 155-162.
62. Hirao, A., Ehlers, R.-U., Strauch, O. 2010. Life cycle and population development of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda, Rhabditida) in monoxenic liquid culture. *Nematology*, 12, 201-210.
63. Hodda, M. 2011. Phylum Nematoda Cobb 1932. In: Zhang, Z.-Q. (ed.) *An outline of higher-level classification and a survey of taxonomic richness*. Magnolia Press: Zootaxa. 3148, 63-95.
64. Hominick, W. M. 2002. Biogeography. In: Gaugler, R. (ed.) *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford: CAB International.
65. Jabbour, R., Barbercheck, M. E. 2008. Soil and habitat complexity effects on movement of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in maize. *Biological Control*, 47, 235-243.
66. Jaworska, M., Dudek, B. 1992. A survey of insect parasitic nematodes in the soil of some crops. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolnictwa im. Hugona Kolltaja w Krakowie, Ogrodnictwo*, 20, 131-147.

67. Jung, K. 1996. Storage of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* at two temperatures. Effect on infectivity, energy reserve and number of bacteria. *Bulletin Organisation internationale de lutte biologique contre les animaux et les plantes nuisibles, Section regionale ouest paléarctique*, 19, 103-106.
68. Kepenekci, I., Gokce, A., Gaugler, R. 2004. Virulence of three species of entomopathogenic nematodes to the chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematropica*, 34, 199-204.
69. Khan, A., Brooks, W. M., Hirschmann, H. 1976. *Chromonema heliothidis* n. gen., n. sp. (Steinernematidae, Nematoda), a parasite of *Heliothis zea* (Noctuidae, Lepidoptera), and other insects. *Journal of Nematology*, 8, 159-168.
70. Kharchenko, V. A., Sigareva, D. D., Galagan, T., Olenenko, V. Study of entomopathogenic nematodes from genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* in Ukraine. In: Nationala, B., ed. XIth European Multicolloquium Of Parasitology, July 25th-29th 2012 Cluj-Napoca – Romania. 506.
71. Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Mantahar, H. K., Moens, M. 2010. Natural occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Nepal. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108, 74-78. doi: 10.1016/j.jip.2009.10.007.
72. Koppenhöfer, A. M., Fuzy, E. M. 2006. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 11-12.
73. Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biological Control*, 21, 230-248. doi: 10.1006/bcon.2001.0938.
74. Lackie, A. M. 1988. Immune mechanisms in insects. *Parasitology Today*, 4, 98-105.
75. Laznik, Ž., Tóth, T., Lakatos, T., Vidrih, M., Trdan, S. 2009. First record of a cold-active entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* (Steiner) (Rhabditida: Steinernematidae) in Slovenia. *Acta agriculturae Slovenica*, 93, 37-42.

76. Mankin, R. W., Brrahorst-Hubbard, J., Fltraers, K. L., Zhang, M., Crocker, R. L., Lapointe, S. L., Martinez De Altube, M. D. M., Strauch, O., Fernťaez De Castro, G., Martinez Pena, A. 2008. Control of the flat-headed root borer *Capnodis tenebrionis* (Linne) (Coleoptera: Buprestidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Nematoda: Steinernematidae) in a chitosan formulation in apricot orchards. *Biological Control*, 53, 531-539.
77. Meteo.Ua. 2015. Available: <http://meteo.ua/archive> 2015.
78. Meteopost. 2015. Available: <http://meteopost.com/weather/archive/> 2013.
79. Meyling, N. V. 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. *Laboratory manual*, 1-18.
80. Molyneux, A. S. 1986. *Heterorhabditis* spp. ta *Steinernema* (= *Neoaplectana*) spp.: temperature, ta aspects of behavior ta infectivity. *Experimental Parasitology*, 62, 169-180.. doi: 0014-4894/8.
81. Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., Schäffer, A. A. 2008. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics*, 24, 1757-1764.
82. Morton, A., Garcia-Del-Pino, F. 2013. Sex-related differences in the susceptibility of *Periplaneta americana* ta *Capnodis tenebrionis* to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, 203-7. doi: 10.1016/j.jip.2012.11.012.
83. Morton, A., García-Del-Pino, F. 2009. Virulence of entomopathogenic nematodes to different stages of the flatheaded root borer, *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae). *Nematology*, 11, 365-373.
84. Mráček, Z., Kindlmann, P., Jerskov, J. 2005. Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts ta new faunistic records for the Czech Republic *Biological Control*, 34, 27-37.
85. Mracek, Z., Půža, V., Nermut, J. 2014. *Steinernema poinari* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from the Czech Republic. *Zootaxa*, 3760, 336-350. doi: 10.11646/zootaxa.3760.3.2.

86. Mráček, Z., Sturhan, D., Reid, A. 2003. *Steinernema weiseri* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. *Systematic Parasitology*, 56, 37-47.
87. Mráček, Z., Webster, J. M. 1993. Survey of Heterorhabditidae ta Steinernematidae (Rhaditida, Nematoda) in Western Canada. *Journal of Nematology*, 25, 710-717.
88. Nasmith, C. G., Speranzi, D., Jeng, R., Hubbes, M. 1996. RFLP analysis of PCR amplified ITS ta 26S ribosomal RNA genes of selected entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Nematology*, 28, 15-25.
89. Negrisoli, A. S., Jr., Barbosa, C. R. C., Moino, A., Jr. 2008. Avaliação da Compatibilidade de Produtos Fitossanitários com Nematóides Entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) Utiliztao o Protocolo Modificado da IOBC/WPRS. *Nematologia Brasileira*, 32, 111-116.
90. Nguyen, K. B., Hunt, D. J. 2007. *Entomopathogenic nematodes: Systematics, Phylogeny ma Bacterial symbionts*, Leiden-Boston, Brill.
91. Nguyen, K. B., Maruniak, J., Adams, B. J. 2001. Diagnostic ta Phylogenetic Utility of the rDNA Internal Transcribed Spacer Sequences of *Steinernema*. *Journal of Nematology*, 33, 73-82.
92. Nguyen, K. B., Smart, G. C., Jr. 1994. *Neosteinerinema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller) *Journal of Nematology*, 26, 162-174.
93. Nguyen, K. B., Smart, G. C., Jr. 1995. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. ta *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology*, 27, 206-212.
94. Nguyen, K. B., Smart, G. C., Jr. 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae ta Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology*, 28, 286-300.
95. Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12, 357-358.

96. Pereira, C. 1937. *Rhabditis hambletoni* n. sp. nema aparentemente semiparasito da “broca do algodoeiro” (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Archivo do Instituto Biologic*, 8, 215-230.
97. Peters, A. 1996. The natural host range of *Steinernema* та *Heterorhabditis* spp. та their impact on insect populations. *Biocontrol Science ma Technology*, 6, 389-402.
98. Poinar, G. O., Jr. 1990. Taxonomy та biology of Steinernematidae та Heterorhabditidae. In: Gaugler, R., Kaya, H. K. (eds.) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton: FL: CRC Press.
99. Poinar, G. O., Jr., Thomas, G. M., Hess, R. 1977. Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematologica*, 23, 97.
100. Půža, V., Nermut', J. 2015. Entomopathogenic nematodes in the Czech Republic: diversity, occurrence та habitat preferences. In: Campos-Herrera, R. (ed.) *Nematode pathogenesis of insects ma other pests. Ecology ma applied technologies for sustainable plant ma crop protection*. Switzerland: Springer International Publishing.
101. Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P. V. D., Ayres, D., Darling, A., Hohna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., Huelsenbeck, J. P. 2011. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference та model choice across a large model space. *Systematic Biology*.
102. Staner, H., Bednarek, A. 1987. Entomophilis nematodes in the Swietokrzyski National Park. *Fragmenta Faunistica*, 31, 3-9.
103. Seinhorst, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4, 67-69.
104. Shapiro, D. I., Lewis, E. E., Paramasivam, S., Mccoy, C. W. 2000. Nitrogen partitioning in *Heterorhabditis bacteriophora*-infected hosts та the effects of nitrogen on attraction/repulsion. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76, 43-48.
105. Shishiniova, M., Budurova, L., Gradinarov, D. 1998. *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Nematoda:Rhabditida) – new species for

entomopathogenic fauna of Bulgaria. *Experimental Pathology and Parasitology*, 1, 30-35.

106. Shishiniova, M., Budurova, L., Gradinarov, D. 2000. Entomopathogenic nematodes from Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in Bulgaria. *IOBC wprs Bulletin*, 23, 75-78.

107. Sigareva, D. D., Olenenko, V. V., Gratsianova, N. V. Natural distribution of entomopathogenic nematodes Steinernematidae in the orchard, forest and field biocenosis of Central Forest-Steppe of Ukraine. Интегрированная защита садов и виноградников =[The Integrated Protection of Gardens and Vineyards]: материалы международной научно-практической конференции, 8-13 сентября 2008 г. 2008 Одесса. УААН, Институт защиты растений, Международная организация по биологической борьбе с вредными животными и растениями, Восточнопалеарктическая секция, 187-190.

108. Smits, P. H., Ehlers, R.-U. 1991. Identification of *Heterorhabditis* spp. by morphometric characters and RFLP and of their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. by species specific DNA probes. *Bulletin of the International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants*, 14, 195-201.

109. Spiridonov, S. E., Grunder, J. M. The comparison of rDNA for allopatric steinernematid isolates of "glaseri - group" in Europe. 2003. *COST 850 Meeting "Identification of Long dauer juvenile nematode species from EU and the Mediterranean"*, Budapest, Hungary.

110. Spiridonov, S. E., Reid, A. P., Podrucka, K., Subbotin, S. A., Moens, M. 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features. *Nematology*, 6, 547-566.

111. Sriram, K. I., Lakshmi, C. J. 2001. Population fluctuation of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* sp. in South Taaman as influenced by weather parameters. *Current Science*, 80, 923-924.

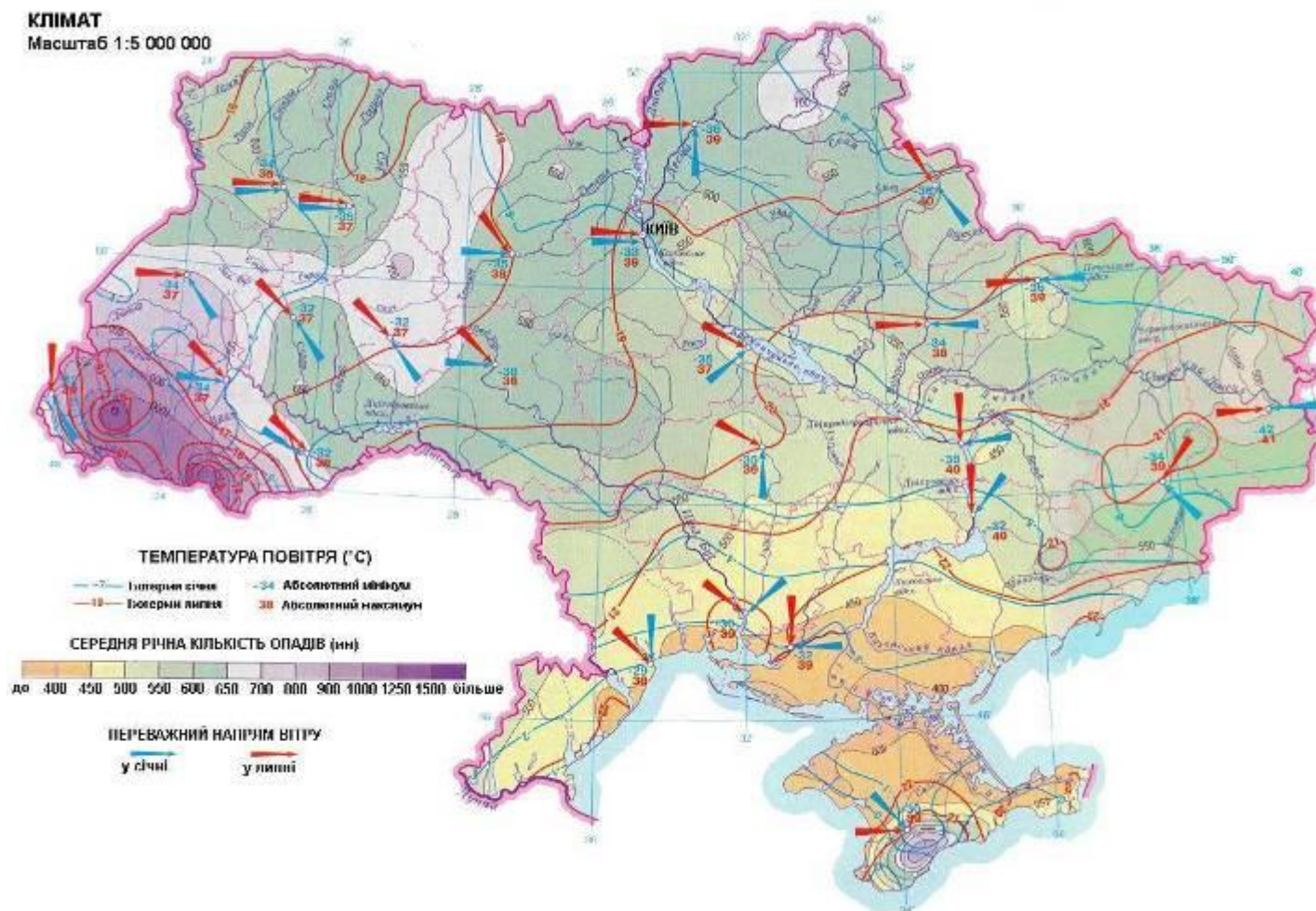
112. Statsoft, Inc. 2011. *STATISTICA (data analysis software system)* [Online]. Available: www.statsoft.com.

113. Steiner, G. 1923. *Aplectana kraussei* n. sp., eine in der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematodenform, nebst Bemerkungen über das Seitenorgan der parasitischen Nematoden. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten und Hygiene*, 59, 14-18.
114. Steiner, G. 1929. *Neoaplectana glaseri* n. g., n. sp. (Oxyuridae) a new nemtic parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 19, 436-440.
115. Stock, S. P., Banna, L. A., Darwish, R., Katbeh, A. 2008. Diversity ta distribution of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) ta their bacterial symbionts (γ -Proteobacteria: Enterobacteriaceae) in Jordan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 228-234. doi: 10.1016/j.jip.2008.01.003.
116. Stock, S. P., Pryor, B. M., Kaya, H. K. 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae ta Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. *Biodiversity ma Conservation*, 8, 535-549.
117. Stock, S. P., Strong, D., Gardner, S. L. 1996. Identification of *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from California with a new species isolated from the larvae of the ghost moth *Hepialis californicus* (Lepidoptera: Hepialidae) from the Bodega Bay Natural Reserve. *Fundamental applied Nematology*, 16, 585-592.
118. Sturhan, D., Liskova, M. 1999. Occurrence ta distribution of entomopathogenic nematodes in the Slovak Republic. *Nematology*, 1, 273-277.
119. Sturhan, D., Spiridonov, S. E., Mráček, Z. 2005. *Steinernema silvaticum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. *Nematology*, 7, 227-241.
120. Susurluk, I. A. 2008. Seasonal ta vertical distribution of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (TUR-H2) ta *Steinernema feltiae* (TUR-S3) in turf ta fallow areas. *Nematology*, 11, 321-327.

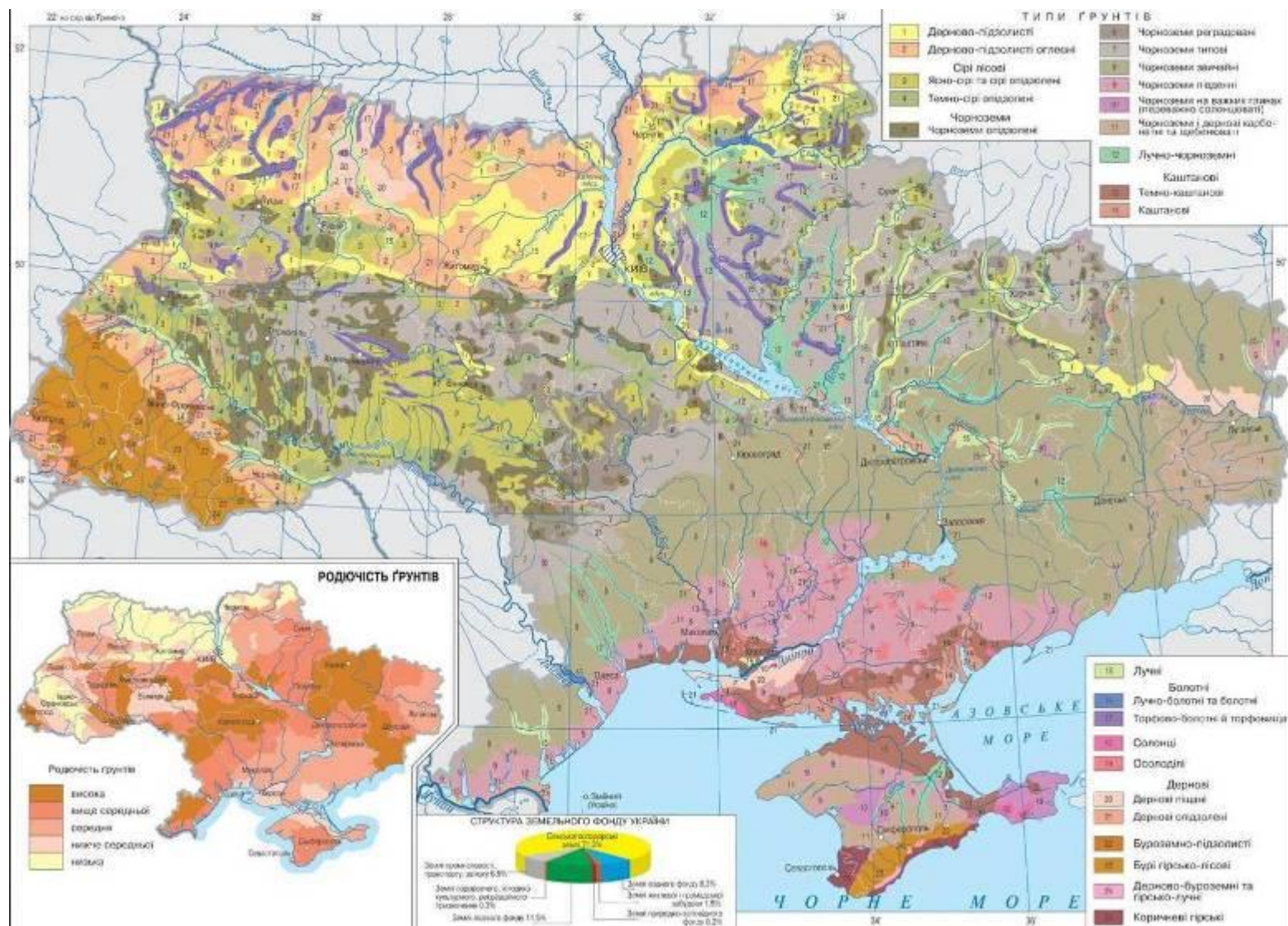
121. Szalanski, A. L., Taylor, D. B., Mullin, P. G. 2000. Assessing nuclear and mitochondrial DNA sequence variation within *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 32, 229-233.
122. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
123. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*.
124. Torr, P., Heritage, S., Wilson, M. J. 2004. Vibrations as a novel signal for host location by parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology*, 34, 997-999.
125. Tóth, T. 2006. Collection of entomopathogenic nematodes for the biological control of insect pests. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14.
126. Travassos, L. 1927. Sobre o genero *Oxysomatium*. *Boletim Biologico*, 5, 20-21.
127. Tumialis, D., Gromadka, R., Skrzecz, I., Pezowicz, E., Mazurkiewicz, A., Popowska-Nowak, E. 2014. *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) (Rhabditida: Steinernematidae) — the first record from Poland. *Helminthologia*, 51, 162-166. doi: 10.2478/s11687-014-0224-9.
128. Weiser, J. 1955. *Neoaplectana carpocapsae* sp. n. (Anguillulata, Steinernematidae), nový cizopasník housenek obaleče jablečného, *Carpocapsa pomonella* L. *Věstník Československé Zoologické Společnosti*, XIX, 44-52.
129. Weiser, J., Köhler, W. 1955. *Neoaplectana janickii* n. sp. nový cizopasník larev ploskohřebky *Acantholyda nemoralis* Thoms. v Polsku. *Roczniki Nauk Leśnych*, 138, 93-110.
130. Wojcik, W. F. 1986. Influence of temperature on the growth of the *Neoaplectana carpocapsae* Weiser, 1955 nematodes. *Animal science*, 20, 87-95.

131. Wouts, W. M. 1980. Biology, life cycle and redescription of *Neoaplectana bibionis* Bovien, 1937 (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 12, 62-72.
132. Wouts, W. M. 1991. *Steinernema* (*Neoaplectana*) and *Heterorhabditis* Species. In: Nickle, W. R. (ed.) *Manual of agricultural nematology*. New York: CRC Press.
133. 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, 255-264. doi: 10.1515/ap-2017-0032.
134. Yakovlev, Ye. B., Kharchenko, V. A. 2015. The effect of temperature on the development of adult generations of entomopathogenic nematode *Steinernema arenarium* isolate CH. *Vestnik zoologii*, 49, 325-332. doi: 10.1515/vzoo-2015-0035.
135. Yakovlev, Ye. B., Kharchenko, V. A. 2016. Over World Distribution of Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda, Panagrolaimida et Rhabditida) Entomopathogenic Nematodes. *Studia Biologica*, 10, 175-182.
136. 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. doi: 10.2478/vzoo-2014-0023.
137. Yu, H., Gouge, D. H., Baker, P. B. 2006. Parasitism of Subterranean Termites (Isoptera: Rhinotermitidae: Termitidae) by Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae). *Journal of Economic Entomology*, 99, 1112-1119.
138. Yu, H., Gouge, D. H., Stock, S. P., Baker, P. B. 2008. Development of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) in the Desert Subterranean Termite *Heterotermes aureus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Nematology*, 40, 311-317.
139. Zioni (Cohen-Nissan), S., Glazer, I., Segal, D. 1992. Life cycle and reproductive potential of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain H P88. *Journal of Nematology*, 24, 352-358.

ДОДАТКИ



Додаток А. Мапа середньорічних температур на території України.



Додаток Б. Мапа ґрунтів України.

Додаток В.

Порівняння вирівняних та скорочених послідовностей ізолятів виду *S. feltiae*, виділених на території України.

№	Послідовності
	1-100
DONR	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
Kar-4	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
Kar-13	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
KM	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
Kan	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
Gol-3	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
Gol-2	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
Ask-12	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
Ask-6-2	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
Gol-7	TCTTGGATTCCGAGCTGAATTTTCGCTGTTTCGTTTCAAAGCGTTGTATTTCTCAACTACGGCTATGAATGGTTTCTATAGGTGTCTGGAGCAGTTGTATG
	101-200
DONR	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGATTCTGTGACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
Kar-4	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGATTCTGTGACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
Kar-13	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGATTCTGTGACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
KM	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGATTCTGTGACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
Kan	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGTTTCGGTAACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
Gol-3	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGTTTCGGTCACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
Gol-2	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGTTTCGGTAACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
Ask-12	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGTTTCGGTCACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
Ask-6-2	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGTTTCGGTCACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
Gol-7	AGCGTGACTGTGGTGATGGACATTTGATTCTGCGACTAGAAATTAAGAAGTCTGTAACTCGCCGTTCTTAAAAACTTCAATTAACGTTTGATCAATTTG
	201-300
DONR	ACTGCACCACCGTAGGTGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG
Kar-4	ACTGCACCACCGTAGGTGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG
Kar-13	ACTGCACCACCGTAGGTGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG
KM	ACTGCACCACCGTAGGTGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG
Kan	ACTGCACCACCGTAGGTGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG
Gol-3	ACTGCACCACCGTAGGTGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGGGGATCACTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG
Gol-2	ACTGCACCACCGTAGGTGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG
Ask-12	ACTGCACCACCGTAGGTGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG
Ask-6-2	ACTGCACCACCGTAGGTGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGTTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG
Gol-7	ACTGCACCACCGGAGGCGTACTTAAAGTTTATCAAGTCTTGTTCGGGGGATCACTCGGTTTCGTATCTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCGTTATTTGGCG

301-400

DONR	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGACCT
Kar-4	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGACCT
Kar-13	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGACCT
KM	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGACCT
Kan	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGACCT
Gol-3	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAATATGTGTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGACCT
Gol-2	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGACCT
Ask-12	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGACCT
Ask-6-2	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAGTATGTTTGGTTGAGGGTCGATTAATTCGACCT
Gol-7	TGAATTGCAGACATATTGAACGCTAAAAATTTTGAACGCAAATGGCACTATCAGGTTTATATCTGTTAATATGTGTGGTTGAGGGTCGATTAATTCCTACCT

401-500

DONR	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTTTCGATATTATTTGGATCGGTCTTTTTGGAGTGATGTTGCTATTCGTTTCATCAACGAATTTTTATGTGAATGTTTTGGT
Kar-4	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTTTCGATATTATTTGGATCGGTCTTTTTGGAGTGATGTTGCTATTCGTTTCATCAACGAATTTTTATGTGAATGTTTTGGT
Kar-13	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTTCAATATTATTTGGATTGGTCTTTTTGGAGTGATGTTGCTATTCGTTTCATCAACGAATTTTTATGTGAATGTTTTGGT
KM	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTTTCGATATTATTTGGATCGGTCTTTTTGGAGTGATGTTGCTATTCGTTTCATCAACGAATTTTTATGTGAATGTTTTGGT
Kan	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTTTCGATATTATTTGGATCGGTCTTTTTGGAGTGATGTTGCTATTCGTTTCATCAACGAATTTTTATGTGAATGTTTTGGT
Gol-3	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTTCCATATTATTTGGATTGGATTGTTTGGAGTGATTGTTATCCCTTCCAACAACAAATTTTAAAGTGAGGGTTTTGGGT
Gol-2	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTTTCGATATTATTTGGATCGGTCTTTTTGGAGTGATGTTGCTATTCGTTTCATCAACGAATTTTTATGTGAATGTTTTGGT
Ask-12	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTTTCGATATTATTTGGATCGGTCTTTTTGGAGTGATGTTGCTATTCGTTTCATCAACGAATTTTTATGTGAATGTTTTGGT
Ask-6-2	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTTTCGATATTATTTGGATCGGTCTTTTTGGAGTGATGTTGCTATTCGTTTCATCAACGAATTTTTATGTGAATGTTTTGGT
Gol-7	GCAGTCGCTGTGACGTTTTTCCAGTATTTTTGAAGCGGTCTTTTTGGAGTGATGTTGCTATTCGTTTCATCAACGAATTTTTATGTGAATGTTTTGGT

501-569

DONR	GTTTCGTTTCCTTGCCACTGATGACAACCTTAAGTTATTTTTTCAGATTTTAGGCCCTTAGTACTCACTTG
Kar-4	GTTTCGTTTCCTTGCCACTGATGACAACCTTAAGTTATTTTTTCAGATTTTAGGCCCTTAATACTCACTTG
Kar-13	GTTTCGTTTCCTTGCCACTGATGACAACCTTAAGTTATTTTTTCAGATTTTAGGCCCTTAATACTCACTTG
KM	GTTTCGTTTCCTTGCCACTGATGACAACCTTAAGTTATTTTTTCAGATTTTAGGCCCTTAATACTCACTTG
Kan	GTTTCGTTTCCTTGCCACTGATGACAACCTTAAGTTATTTTTTCAGATTTTAGGCCCTTAATACTCACTTG
Gol-3	TTCCCGTTTCGTGGCACGAATGACAACCTTAAATTATATTTTTCAATTTTAAAGCCCTTATACACTGCTG
Gol-2	GTTTCGTTTCCTTGCCACTGATGACAACCTTAAGTTATTTTTTCAGATTTTAGGCCCTTAATACTCACTTG
Ask-12	GTTTCGTTTCCTTGCCACTGATGACAACCTTAAGTTATTTTTTCAGATTTTAGGCCCTTAATACTCACTTG
Ask-6-2	GTTTCGTTTCCTTGCCACTGATGACAACCTTAAGTTATTTTTTCAGATTTTAGGCCCTTAATACTCACTTG
Gol-7	GTTTCGTTTCCTTGCCACTGATGACAACCTTAAATCGTATTTTCAGATTTTAGGCCCTTAAATACTCACTTG