

На правах рукописи

ПОЛЯНИНА КРИСТИНА СЕРГЕЕВНА

**КСИЛОБИОНТНЫЕ НЕМАТОДЫ ЛИСТВЕННЫХ ДРЕВЕСНЫХ
РАСТЕНИЙ: ФАУНА, ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ И ПАРАЗИТО-
ХОЗЯИННЫЕ ОТНОШЕНИЯ**

Специальность 1.5.17. Паразитология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Зоологический институт Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук **Рысс Александр Юрьевич**

Официальные оппоненты:

Спиридонов Сергей Эдуардович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук, заведующий лабораторией, главный научный сотрудник

Гранович Андрей Игоревич, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», заведующий кафедрой, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук»

Защита состоится «___» ноября 2023 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.026.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Зоологический институт Российской академии наук по адресу: 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук, <https://www.zin.ru/boards/24.1.026.01/theses.html>

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук _____ Ахметова Лилия Агдасовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Фитонематоды наносят большой вред сельскому и лесному хозяйству по всему миру, десять видов включены в списки особо вредоносных карантинных организмов (Jones et al., 2013). В соответствии со Стратегиями научно-технологического развития (Указ Президента РФ 642 от 01.12.2016) одним из главных вызовов служат угрозы воспроизводству природных ресурсов, к которым относятся и лесные и парковые насаждения. Для ответа на вызовы необходимо развитие технологий управления экосистемными процессами, в том числе для снижения паразитарной нагрузки на виды важные для здоровья и хозяйственной деятельности человека древесных растений. Лиственные деревья – важный элемент насаждений и ресурс строительства и фармакологии. Защита насаждений подразумевает знание фауны фитогельминтов, их переносчиков и жизненных циклов.

Степень разработанности темы исследования. Фитогельминты древесных растений хорошо известны по исследованиям нематод хвойных (Fuchs, 1929, 1930, 1937; Rühm, 1956; Лазаревская, 1961, 1963; Губина, 1980; Коренченко, 1980, 1987; Курашвили и др., 1980; Ерошенко, Волкова, 1988; Круглик, 2003; Шестеперов 1995; Braasch et al., 2001; Кулинич и др., 2003). Большинство публикаций посвящено *Bursaphelenchus xylophilus*, патогену вилта сосны, внесенному в карантинные списки по всему миру и исключительно вредоносному (Ruehle, 1962, 1972; Bergdahl, 1988; Ferraz, Brown, 2002; Mota et al., 1999; Jones et al., 2008; Kulinich et al., 2013, 2021; Arbuzova et al., 2016, 2020, 2021). Но стволовым гельминтам лиственных деревьев России до сих пор практически не уделялось внимания, что обусловило цель нашего многолетнего (2014-2023) исследования фауны, жизненных циклов и вредоносности стволовых нематод, паразитирующих в трех широко распространенных видах лиственных деревьев: вяза, ясеня и дуба.

Цель исследования – выявление нематофауны больных лиственных деревьев с особым вниманием к видам фитопатогенных нематод, ассоциированных с ксилобионтными жуками – переносчиками трансмиссивных болезней растений.

Задачи исследования

1. Изучить фауну ксилобионтных нематод, классификация ассоциаций нематод с насекомыми для выявления группы настоящих или оппортунистических фитопатогенов; описание и переписание видов, видовая диагностика и выявление новых морфотаксономических признаков;
2. Проанализировать филогению стволовых нематод лиственных деревьев и эволюцию ассоциации ксилобионтных нематод с насекомым и растением-хозяином;
3. Изучить морфогенез и жизненные циклы ксилобионтных нематод, ассоциированных с жуками, выявить стадии трансмиссии жуком;
4. Изучить параметры онтогенеза и популяционной динамики ксилобионтных нематод;
5. Определить вероятность возникновения независимой от переносчика специфичности у фитопатогенных нематод к растениям-хозяевам;
6. Сформулировать практические рекомендации по локализации очагов болезней древесных насаждений.

Научная новизна исследования

1. Впервые выявлено, что в ассоциацию Голландской болезни вязов входят не только грибы рода *Ophiostoma* и жуки рода *Scolytus*, но и нематоды рода *Bursaphelenchus*.
2. Впервые выявлена независимая от предпочтений переносчика специфичность нематод рода *Bursaphelenchus* к природному растению-хозяину.
3. Впервые обнаружено, что трансмиссивные личинки нематод рода *Bursaphelenchus*, относящиеся к разным филогенетическим группам, отличаются друг от друга стадией развития, и это обусловлено специфичностью гельминтов к роду или семейству переносчиков.
4. Впервые выявлены параметры онтогенеза и динамики популяции *in vitro* модельных видов фауны ксилобионтных нематод, разработаны формулы для характеристики экспоненциального роста числа самок и общей популяции нематод *in vitro*.

5. Впервые прослежены все стадии онтогенеза модельных видов ксилобионтных нематод, ассоциированных с жуками, от кладки яйца половозрелой самкой до половозрелых особей.

Теоретическое значение работы

Исследование вносит вклад в познание практически не изученной в России фауны стволовых нематод лиственных деревьев и может послужить основой для мониторинга инфекций лесных и парковых насаждений. Результаты важны для глубокого понимания эволюции жизненных циклов энтомохорных стволовых нематод, разнообразия их трансмиссивных стадий, разработки математических моделей роста популяций. Впервые доказана двойственность специфичности энтомохорных нематод как к хозяевам, так и к переносчикам, что вносит вклад в понимание причин сложных ассоциативных связей паразитов и происхождения их поликсенных циклов.

Практическое значение работы

1. Составлен атлас видов ксилобионтных нематод из лиственных древесных растений с симптомами вилта и суховеершинности и краткие диагностические ключи.

2. Разработана диагностика стадий онтогенеза ксилобионтных нематод, включая трансмиссивных дауер-личинок и стадий диапаузы.

3. Разработана методика постановки фитотестов в лабораторных условиях для выявления специфичности нематод к природному растению-хозяину.

4. Предложена методика экспериментов по выявлению параметров онтогенеза нематод и цикла популяции *in vitro*, что позволяет оценить скорость размножения и время заселения ствола популяцией патогена.

5. На основании обзора взаимоотношений ксилобионтных нематод с жуками-короедами предложена классификация ассоциаций семейств нематод с жуками-короедами, что позволяет выделить патогенную энтомохорную группу среди ксилобионтной нематофауны.

6. Предложены практические рекомендации по локализации очагов болезней древесных насаждений.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фауну нематод лиственных деревьев России составляют виды сем. Aphelenchoididae, Panagrolaimidae, Diplogastridae, Rhabditidae, сгруппированные по новой авторской классификации типов ассоциаций «нематода-насекомое-растение». Наибольшим инфекционным потенциалом обладает энтомохорная группа нематод, которая включает 10 патогенов, ранее не зарегистрированных в РФ.

2. Для диагностики ксилобионтных нематод эффективны вновь выявленные с помощью конфокальной микроскопии и СЭМ структуры копулятивного аппарата и папилл.

3. Модели роста популяций нематод дают возможность оценить скорости заселения деревьев ассоциациями с участием нематод.

4. Специфичность нематод патогенного р. *Bursaphelenchus* двойственная: а) к переносчику; б) к природному растению-хозяину, независимо от переносчика. В разных филогенетических группах *Bursaphelenchus* трансмиссивные личинки отличаются стадией развития, что обусловлено эволюцией паразитарной специфичности к переносчикам.

5. Динамичная ассоциация трех патогенов: нематоды, гриба и жука-переносчика обуславливает оппортунистическую патогенность стволовых гельминтов лиственных деревьев, зависимость от переносчика и гриба; например, ассоциация Голландской болезни вязов (ГБИ) включает не только грибы р. *Ophiostoma* и жуков р. *Scolytus*, но и нематод р. *Bursaphelenchus*.

Степень достоверности и апробация работы

Основные положения и результаты диссертационного исследования представлены в докладах: 1) на Международном нематологическом симпозиуме (Чебоксары – 2015, Нижний Новгород – 2017, Петрозаводск – 2019, Ярославль – 2021); 2) на Международной конференции «Чтения памяти О. А. Катаева» (Санкт-Петербург – 2014, 2016, 2018); 3) на VI и VIII Всероссийских конференциях с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии» (Севастополь – 2018, 2022); 4) на Международной научной конференции, посвященной 75-летию Центра паразитологии и 140-летию со дня рождения академика К.И. Скрыбина (Москва – 2018); 5) на Отчетных сессиях в ЗИН РАН (2019, 2022); 6) на XIX Всероссийском совещании по почвенной зоологии (Улан-Удэ, 2022).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных статей в рецензируемых журналах списка ВАК.

Структура диссертации. Работа состоит из введения, 3 глав: обзор литературных данных, материалы и методы, результаты и обсуждение (включает в себя 5 разделов исследования), а также заключения, выводов, списка литературы из 158 источников (31 на русском языке). Основная часть работы изложена на 183 страницах, содержит 67 рисунков и 29 таблиц. Два приложения (49 стр.) к работе содержат 4 таблицы и 22 иллюстрации.

Благодарности. Благодарю моего научного руководителя Александра Юрьевича Рысса за поддержку на всех этапах обучения, ценные советы, конструктивную критику, помощь в разработке экспериментов, написании статей и подготовке диссертации. Благодарю моих соавторов С.А. Субботина, М.Ю. Мандельштама, И.А. Керчева, А.А. Сазонова, Б.Г. Поповичева, а также С.Г. Медведева и А.А. Петрова, А.И. Соловьеву за обучение и приборную базу; О.Н. Кулинича, В.Б. Звягинцева, А.А. Чалкина, М.В. Мокроусова, Л.Г. Серую, С.А.Кривец, Е.А.Жукову и К.В. Регель за помощь в сборах и материалы; К.В. Галактионова и коллег лаборатории по изучению паразитических червей и протистов, руководителей биостанций ЗИН РАН Н.С. Чернецова и А.А. Сухотина и сотрудников за всестороннее содействие. В работе использована коллекция нематод УФК ЗИН РАН и оборудование ЦКП «Таксон».

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, проект №:14-14-00621 (2014-2016); Российского фонда фундаментальных исследований, проекты № 17-04-00360 (2019), 20-04-00569 (2020-2022), 20-34-90101 «Аспиранты» (2020-2022). Работа выполнена в рамках тем государственных заданий № АААА-А17-117030310322-3 (2019-2021), 122031100260-0 (2022-2024).

Содержание работы

Глава 1 Литературный обзор. Ассоциации ксилобионтных нематод с жуками-короедами

Нематоды способны вызывать вилт и суховершинность как хвойных, так и лиственных пород деревьев. Переносчиками нематод выступают жуки-усачи (Coleoptera: Cerambycidae) и короеды (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), распространяющие трансмиссивные личиночные стадии этих паразитов во время дополнительного питания после вылета из куколочной камеры или при яйцекладке на растениях-хозяевах. Жуки разносят нематод комплектом вместе с фитопатогенными грибами и бактериями (в особых нематангиях и микангиях), а нематоды способствуют инфекционному распределению последних по стволу при заселении дерева. Фитомикопаразиты с энтомохорной трансмиссией в жизненном цикле образуют ассоциации с другими патогенами – грибами и бактериями, которые приводят живые древесные растения к гибели. Это особая энтомохорная экогруппа, включающая патогенных фито-микопаразитов и бактериотрофов-комменсалов. Другие виды нематод являются участниками процесса разложения мертвой древесины и их таксономический состав на уровне родов и семейств идентичен нематодам детритной пищевой сети в почве, для которой уже имеется классификация почвенных экологов по принципу гильдий (сочетания типа питания и стадии *c-p* шкалы по Ferris et al., 2001).

Еще одна экогруппа объединяет эндопаразитов насекомых, снижающих плодовитость хозяев; эта группа перспективна для биоконтроля переносчиков эпифитотий. Опубликованы сводки по нематодам, ассоциированным с короедами хвойных, однако нематодам лиственных пород деревьев уделено недостаточно внимания. Это определило выбор темы диссертации.

Изучение фауны ксилобионтных нематод больных деревьев имеет важное практическое значение, отношения энтомохорных нематод с жуком важны для понимания структуры фауны стволовых нематод. Систематизация типов отношений в ассоциациях «жук – нематода – растение-хозяин» является важной для практических целей, а именно для диагностики и контроля вредителей древесных растений. Ассоциации нематод, жуков-переносчиков и их симбионтов – бактерий и грибов – причиняют большой вред лесному хозяйству по всему миру, оцениваемый в сотни миллионов долларов (Кулинич и др., 2003; Ruehle, 1962, 1972; Bergdahl, 1988, Ferraz, Brown, 2002). Необходим мониторинг и систематизация публикаций, связанных с нематодами и их переносчиками России и сопредельных стран. К классическим сводкам (Fuchs, 1937; Rühm, 1956; Massey, 1971; Курашвили и др., 1980) добавились новые сведения о находках

стволовых нематод из лесных и парковых насаждений с симптомами болезней деревьев (Braasch et al., 2001; Kim, Robbins, 2008; Kanzaki et al., 2011; Grucmanova et al., 2013; Kanzaki et al., 2015; 2018 и др.).

В нашем обзоре предпринята попытка создания сводки по мировой фауне нематод-хвойных и лиственных деревьев России и сопредельных стран. Были рассмотрены и обобщены сведения о типах ассоциаций нематод, связанных с короедами Coleoptera: Curculionidae и усачами Cerambycidae, хвойных и лиственных деревьев (мировая фауна). Жуки переносят инвазионных личинок нематод во время дополнительного питания или яйцекладки. Помимо фитопатогенных нематод, с короедами связаны транспортируемые ими микотрофы и бактериотрофы и собственно паразиты короедов. Предложена классификация из 10 типов ассоциаций ксилобионтных нематод, ассоциированных с жуками: 1. Свободноживущие нематоды – факультативные форонты (Бактериотрофы; Микотрофы; Хищники). 2. Эктофоронты облигатные (Эктофоронты: микотрофы и фито-микотрофы; Эктофоронты-хищники). 3. Эндopазиты гемоцеля или кишечника (Паразиты кишечника короедов; Паразиты гемоцеля: Паразиты гемоцеля на стадии личинки; Половозрелые паразиты гемоцеля). Дана суммарная таблица для обнаруженных видов с полями: вид нематоды, вид переносчика, семейство и вид растения, страна и регион, источник. Рассмотрено 55 видов из 15 родов. Параллельно с оригинальной классификацией для сравнения дана классификация группы родов нематод детритной пищевой сети по Феррис и др. (Ferris et al., 2001).

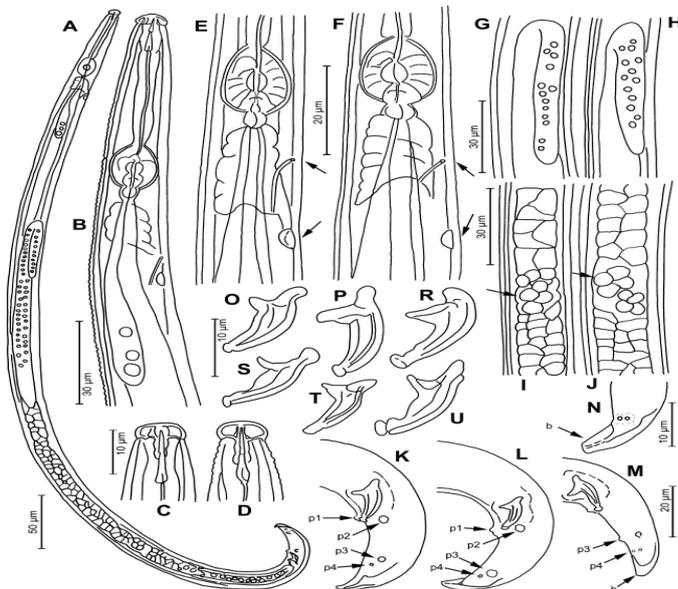


Рисунок 1 *Bursaphelenchus ulmophilus* Ryss, **Polyanina**, Popovichev, Subbotin, 2015. Самец. А – контур тела; В – передняя область; С, D – голова и стилет; Е, F – экскреторная пора (верхняя стрелка) и гемизонид (нижняя стрелка); G, H – обращенный кончик семенника со сперматогониями; I, J – сперматиды (стрелки); K-N – конец хвоста (p1-p4 = хвостовые папиллы самца; b = бурса); O, P, R, S, T, U – вариации формы спикул.



Рисунок 2 Различия основных семейств ксилобионтных нематод по структуре глотки (фауна дуба): А, В – Panagrolaimidae; С-D – Aphelenchoididae; Е – Plectidae; F – Tylenchidae; G – Monhysteridae; H – Sphaerulariidae; J – Rhabditidae; K – Anatonchidae. Шкала: А-Е, Н-К – 10 мкм, F – G – 5 мкм. Оригинальные изображения

В обзоре выделены ассоциации нематод по степени связи с насекомым (переносчиком или хозяином). Данные обзора с характеристикой типов ассоциаций нематод представлены в Таблице 1 (мировая фауна) и Таблице 2 (оригинальные данные находок диссертационного исследования). В таблицы, кроме фитопатогенов, включены энтомопаразиты, как потенциальные антагонисты переносчиков (*Deladenus* spp., *Parasitorhabditis* spp.), рассмотрены перспективы использования этих нематод как объекта биоконтроля насекомых-вредителей.

Основные морфологические структуры ксилобионтных нематод представлены на Рисунке 1, на примере вязовой нематоды *Bursaphelenchus ulmophilus*, нового вида патогена, обнаруженного в ходе диссертационного исследования. На Рисунке 2 даны различия основных семейств ксилобионтов по структуре глотки.

Болезнь ильмовых – Голландская болезнь (ГБИ) привела к большим экономическим потерям по всему миру (Dunn, 2000; Щербакова, Мандельштам, 2014; Дорофеева, Тюпина, 2002; Дорофеева, 2008; Мощеникова, 2011). Ранее считалось, что патогенная ассоциация включает в себя грибы сем. Ophiostomataceae (*Ophiostoma ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi*) и жуков-переносчиков рода *Scolytus* (Schwarz, 1922; Sinclair, Campana, 1978; Webber, Brasier, 1984; Brasier, 1991, 2000; Ghelardini L., 2006; Ryss et al., 2015; Мозолевская и др., 1987; Черпаков, 2011; Жуков, Гниненко, 2012; Щербакова, 2014). Наши исследования дополнили ассоциацию видами нематод, использующими *Scolytus* spp., как переносчиков. Симптомы ГБИ: вилт, усыхание ветвей с увядающими листьями. Фитопатология: поражение и отмирание флоэмы (коричнево-красное кольцо вокруг проводящего цилиндра).

Суховершинность ясеня. Основной патоген – гриб *Chalara fraxinea* (Miller, Hiemstra, 1987; Kowalski, 2006; Kirisits et al., 2008; Schumacher et al., 2007; Лесопатология, 2015), указывают также изумрудную узкотелую златку (*Agrilus planipennis*) (Lygis, et al., 2004; Cech, 2006; Poland, McCullough, 2006; Orlova-Bienkowskaja, 2014; Emerald, 2014; Selikhovkin et. al., 2022; Баранов и др., 2010; Ижевский, Мозолевская, 2008; Баранчиков, 2013; Орлова-Беньковская, 2013). Потенциально патогенными являются также переносчики нематод: большой (*Hylesinus crenatus*) и пестрый (*Hylesinus fraxini*) ясеневые лубоеды (Ryss, Polyana et al., 2019). Симптомы суховершинности ясеня: дефолиация и отмирание ветвей кроны.

Вилт дуба характеризуется поражением сосудистой системы ее закупоркой мицелием грибка *Bretziella fagacearum* (сем. Ceratocystidaceae) (Henry, Moses, 1943; Dey et al., 2008; Johnson et al., 2009; Reif et al., 2010, Любимов и др., 2008, Чернодубов, 2014; Морозова и др., 2016; Пигорев и др., 2018; <https://gd.eppo.int/taxon/CERAFAD/datasheet>). Микоз вызывает потерю тургора листьев, увядание кроны дерева (Stambaugh, Nelson, 1956; True et al., 1960; Пигорев и др., 2018). Распространение осуществляется жуками сем. Cerambycidae и Curculionidae: Scolytinae (Juzwik et al. 1985, 2011; Gibbs, French 1980; Harrington 2013).

Использована классификация стадий разрушения древесины в лесонасаждениях по Stokland et al., 2012: 1) усыхание веток в кроне дерева, 2) трещины на коре, отпадение кусков коры, 3) кора слетела, полностью обнажив ствол дерева, 4) упавшее дерево, 5) лежащее дерево, поверхность сливается с уровнем лесной подстилки.

Общая логическая структура исследования. Базовым исследованием для каждого вида деревьев послужило описание фауны. Затем идентифицированные виды классифицировали по таксономическим и экологическим группам. Из последних для углубленного исследования жизненных циклов, диагностики, морфологии и филогении выбирали группу энтомохорных нематод. В завершение проведены популяционные исследования *in vitro* и фитотесты на специфичность к растению-хозяину. Эта целевая линия от фаунистики к исследованию эволюции сложных жизненных циклов и системы паразит-хозяин. Рабочая гипотеза состоит в возникновении циклов паразитических стволовых нематод из детритоядных энтомохорных нематод, вовлеченных в деструкцию мертвой древесины.

Таблица 1 Нематоды короедов и типы их ассоциаций (отряд Rhabditida). По: Polyana et al., 2019; сокращено, полные данные с лит. ссылками в основном тексте диссертации

Семейство, подсемейство и вид нематоды	Тип ассоциации с жуком и вызываемые болезни (если есть)
Сем. ALLANTONEMATIDAE	

<p><i>Contortylenchus cunicularii</i>; <i>C. typographi</i></p> <p><i>Neoditylenchus petithi</i></p> <p><i>Neoparasitylenchus hylastis</i>; <i>N. scolyti</i></p> <p><i>Sulphuretylenchus kleinei</i></p> <p>Сем. APHELENCHOIDIDAE Подсем. APHELENCHOIDINAE</p> <p><i>Aphelenchoides</i> spp., <i>Laimaphelenchus</i> spp.</p> <p><i>Ruehmaphelenchus juliae</i>; <i>Tylaphelenchus georginsis</i></p> <p>Подсем. ЕКТАPHELENCHINAE</p> <p><i>Ektaphelenchus scolyti</i>, <i>Cryptaphelenchus</i> spp.; <i>Devibursaphelenchus teratospicularis</i></p> <p>Подсем. PARASITAPHELENCHINAE</p> <p><i>Bursaphelenchus</i> spp.</p> <p><i>Parasitaphelenchus frontalis</i>, <i>P. gyeongbukensis</i>, <i>P. oldhami</i></p> <p>Сем. DIPLOGASTRIDAE</p> <p><i>Rhabditolaimus ulmi</i></p> <p><i>Micoletzky thalendorstii</i></p> <p>Сем. PANAGROLAIMIDAE</p> <p><i>Panagrolaimus dendroctoni</i>; <i>P. scheucherae</i></p> <p>Сем. RHABDITIDAE</p> <p><i>Parasitorhabditis ateri</i> <i>P. bicoloris</i>; <i>P. malii</i></p> <p>Сем. SPHAERULARIIDAE</p> <p><i>Deladenus</i> sp.</p> <p><i>Prothallonema</i> sp. (= "<i>Stictylus bicoloris</i>"); <i>Hexatylus pseudoobtusus</i> (= <i>Stictylus pseudobtusus</i>)</p> <p>Сем. SYCHNOTYLENCHIDAE</p> <p><i>Sychnotylenchus intricati</i>; <i>S. ulmi</i></p>	<p>Облигатные эндопаразиты, личинки и половозрелые в гемоцеле жука <i>C. typographi</i> рекомендованы как агенты биоконтроля <i>Ips typographus</i></p> <p>Эктофоронты, дауеры локализуются на поверхности тела жука, между сегментами и под элитрами</p> <p>Облигатные эндопаразиты, в гемоцеле и жировом теле, личинки покидают хозяина, копуляция в ходах жуков, оплодотворенная самка проникает в личинку жука</p> <p>Половозрелые особи – свободноживущие микотрофы, распространение с тканями растений и водой, но у ряда видов личинки под элитрами жука-переносчика, в трахеях и в мальпигиевых сосудах</p> <p>Эктофоронты короедов на стадии дауер-личинки; взрослые – свободноживущие хищники</p> <p>Форезия личинок и половозрелых особей под элитрами, в трахеях и мальпигиевых сосудах, половозрелые особи в гниющей флоэме: микотрофы, эктопаразиты насекомых или хищники; <i>Cryptaphelenchus bicoloris</i> - облигатные эндопаразиты короедов</p> <p>Дауер-личинки - эктофоронты короедов, половозрелые особи переносятся жуком на здоровые деревья в период яйцекладки и дополнительного питания, распространяются по флоэме или смоляным ходам (у хвойных), микро-фитопаразиты, в том числе опасные паразиты хвойных, а также вяза, дуба, тополя, липы, и тропических деревьев (пальм). Вызывают wilt и суховершинность в ассоциациях с энтомохорными грибами и симбиотическими бактериями.</p> <p>Эндопаразиты в гемоцеле жука на стадии личинки, половозрелые особи – свободноживущие микотрофы в ходах жуков</p> <p>Эктокомменсал, под элитрами и между сегментами жука-хозяина</p> <p>Факультативный фронт жука, хищник</p> <p>Факультативные эктофоронты, локализуются между сегментами жука, бактериотрофы</p> <p>Облигатные эндопаразиты в кишечнике жука, инвазионные личинки 2-й и 3-й стадий в мальпигиевых сосудах и кишечнике жука-хозяина</p> <p>Облигатные эндопаразиты, личинки и половозрелые черви в гемоцеле жука</p> <p>Половозрелые самки эндопаразиты в гемоцеле жука, личинки покидают хозяина через ректум; два поколения: энтомопаразитическое и микотрофное</p> <p>Эктопаразиты короедов; личинки 3-й стадии под элитрами</p>
--	--

Таблица 2 Экологические группы ксилобионтных нематод, связанных с жуками-короедами. По: Polyanina et al. 2019

1. Свободноживущие нематоды – факультативные форонты (F1)	
1.1. Бактериотрофы (F1-Ba)	сем. Rhabditidae, Cephalobidae.
1.2. Микотрофы (F1-Fu)	Виды рода <i>Laimaphelenchus</i> (сем. Aphelenchoididae).
1.3. Хищники (F1-Ca)	Виды рода <i>Micoletzky</i> (сем. Neodiplogastridae).
2. Эктофоронты облигатные (Ec)*	
2.1. Бактериотрофы-энтомо-комменсалы (Ec-Co)	Diplogastridae, Panagrolaimidae
2.2. Эктофоронты: микотрофы (Ec-Fu) и фито-микотрофы (фитопаразиты) (Ec-Fup)	Все виды родов <i>Bursaphelenchus</i> , <i>Devibursaphelenchus</i> , <i>Cryptaphelenchus</i> некоторые виды <i>Aphelenchoides</i> (сем. Aphelenchoididae)*
2.3. Эктофоронты-хищники (Ec-Ca)	Виды родов <i>Ektaphelenchus</i> и <i>Ruehmaphelenchus</i> (сем. Aphelenchoididae)
3. Эндопаразиты гемоцеля или кишечника (En)	
3.1. Паразиты кишечника короедов (En-Int)	Виды рода <i>Parasitorhabditis</i> (сем. Rhabditidae)
3.2. Паразиты гемоцеля (En-Hem)	

3.2.1. Паразиты гемоцеля на стадии личинки (En-Hem-ju)	Виды рода <i>Parasitaphelenchus</i> (сем. Aphelenchoididae)**
3.2.2. Половозрелые паразиты гемоцеля (En-Hem-ad).	Виды рода <i>Deladenus</i> и других родов (сем. Sphaerulariidae), а также родов <i>Contortylenchus</i> , <i>Neoparasitylenchus</i> и <i>Sulphuretylenchus</i> (сем. Allantonematidae)

* Фореция на стадии дауер-личинки. Нематангии – плотные сухие скопления дауеров *Bursaphelenchus* и *Cryptaphelenchus*.

** *Parasitaphelenchus* произошел от общего предка с *Bursaphelenchus* (Hunt, 1993; Ryss et al., 2005; Рысс, 2009), за счет проникновения дауеров в гемоцель через трахеи и покровы насекомого.

Глава 2 Материал и методы

В качестве материала использованы многолетние сборы диссертанта совместно с научным руководителем, а также материалы, поступившие из лесных служб и от соавторов наших публикаций. Образцы были собраны в 12 регионах России и 4 регионах Республики Беларусь.

Мы исследовали нематод массовых лиственных древесных видов России и Беларуси – ильмовых (вязы), ясеня и дуба. При сборе материала учитывались внешние симптомы заболеваний деревьев, переносимых насекомыми-переносчиками. Сбор образцов производился непосредственно из деревьев, имеющих симптомы вилта, суховершинности или усыхания, сбор на разных стадиях декомпозиции древесины. Общее количество исследованных проб древесины и насекомых – 368, коллекционных препаратов, депонированных в УФК ЗИН РАН – 561, линий живых культур нематод 46. Стадии увядания и декомпозиции диагностированы по признакам внешнего вида и анатомической целостности ствола дерева (Stokland et al., 2012). При обработке образцов были использованы общепринятые методики экстракции нематод из древесных образцов и жуков методом Берманна в модификации Рысса (Ryss, 2015, 2017a, b). Культивирование нематод производилось в лабораторных культурах на беспоровой мутантной линии сапротрофного гриба *Botrytis cinerea* Pears. Гриб был размножен на твердой питательной среде: 2% картофельно-глюкозном агаре (КГА) или его модификации 2% картофельно-сахарном агаре (КСА), с добавлением стерилизованных кусочков 10 мм x 5 мм коры дерева хозяина. Фиксация нематод производилась по принципу Seinhorst (1962, 1966, 1974) в модификации Рысса (Ryss, 2002; 2017a; 2017b). Изготовление постоянных и временных окрашенных цитологическим ядерным красителем метиленовым синим или ацет-орсеином препаратов производилось по методикам Рысса (Рысс, 1988; Рысс, Чернецкая, 2009; Ryss, Polyana, 2017, 2018).

Детальное изучение морфологии половозрелых особей модельных объектов производилось с помощью световой, лазерной конфокальной микроскопии (Ryss, Petrov, 2021, 2023; Ryss, Polyana, 2022) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Ryss, Boström, 1995; Ryss et al., 2021). Изучение всех стадий жизненного цикла модельных объектов производилось на фиксированных образцах, окрашенных ядерным красителем (метиленовый синий, ацет-орсеин или заключающая среда Vectashield с ядерной краской DAPI - Vectalab), с помощью цифровой видеофиксации живых нематод (цифровой видеоокуляр TourCam 14 мегапикселей, микроскоп Микмед-6а – Lomo Microsystems, стереомикроскоп Микромед MC-5 ZOOM LED).

Молекулярно-генетические исследования были выполнены по последовательностям 18S, ITS и D2-D3 28S РНК рибосомного кластера. Из образцов нематод экстрагировали ДНК с использованием протеиназы К. Полимеразная цепная реакция, амплификация и секвенирование выполнено по протоколу Tanha Maafi (2003). Выравнивание полученных последовательностей генов было выполнено с использованием ClustalX 1.83. Результаты выравнивания были отредактированы вручную с помощью программы GeneDoc 2.5.0. Последовательности генов были проанализированы методом максимальной вероятности (ML) с использованием программы RAUP* и Байесовым вероятностным (BI) анализом с использованием программы MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001) в рамках модели GTR. По полученным молекулярным последовательностям были построены молекулярно-филогенетические кладограммы.

Методики экспериментов по популяционной динамике *in vitro* (Polyana, Ryss, 2021; Ryss, Polyana, 2022 a, b, c). Для изучения параметров онтогенеза использованы авторские методики с синхронизированными по стадиям цикла развития особями *in vitro*: 1) индивидуальные наблюдения, 2) популяционные наблюдения. Для индивидуального наблюдения развития яиц до вылупления использованы выборки по 10 яиц, для личинок (синхронизированные J2, J3, или J4) выборки по 20 экз.

Для популяционных наблюдений использованы выборки по 20 чашек Петри (две серии по 10 чашек) для каждого вида. Вносили инокулюм (50 для бактериотрофов, 150 для фито-микотрофов) половозрелых самцов и самок в обычном для вида соотношении в 2% среду картофельно-сахарного агара (КСА). За время первой генерации (1G) считали момент, когда число самок вдвое превышало число самок в инокулюме, т.е. каждая самка в среднем произвела самку следующего поколения. Время, когда число яиц или личинок определенной стадии (J2, J3, или J4) впервые превышало число самок в инокулюме, считали за период развития личинки до данной стадии или для яйца – время необходимое для откладки одного яйца. Вторым способом оценки срока развития до J2, J3, или J4 считалось время первого максимума числа вылуплений или линек на данную стадию, в том числе время максимума линек личинки J4 во взрослую особь считали 1G.

Выборка внутри каждой чашки. Для бактериотрофов агаровая среда (толщина 1-2 мм) оставалась прозрачной всё время опыта, поскольку питанием нематод служили бактерии самих нематод, быстро размножающиеся в агаре (детритное садоводство). Поэтому подсчет вели в рандомной серии (n=10) световых полей объектива 10x, равном 3 мм², и вычисляли среднее значение для чашки, и уже по 20 чашкам для каждой даты счета получали статистические параметры – среднее значение, стандартное отклонение, минимум и максимум. Однако для фито-микогельминтов среда непрозрачна, поскольку использован мицелий гриба *B. cinerea*, внесенный в культуру за два дня до инокуляции синхронизированного инокулюма нематод. Поэтому в день подсчета внутри каждой чашки производили выборку 5 агаровых дисков обрезанным до диаметра 5 мм пластиковым наконечником дозатора. Диски объединяли для серии из 10 чашек Петри (использовано 2 серии по 10 чашек), диспергировали в воде, используя шейкер. Из полученной суспензии изымали микродозатором 10 суб-объемов по 100 мкл (для больших численностей по 25 мкл) и определяли число самок, самцов, личинок 2,3,4 стадий и яиц, а также общую численность и соотношения самцов к самкам, доли самок, самцов и каждой стадии личинок. Данные для суб-объемов были пересчитаны для одного среднего объема чашки Петри для общей выборки из 20 чашек Петри (ср. значение, стандартное отклонение, минимум и максимум). Численность нематод подсчитывали на 2, 4, 7, 9, 11, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 и 63 день после инокуляции (DAI). Миграционные группы подсчитывали в недельных смывах с крышек.

Суточную скорость яйцекладки одной самкой оценивали несколькими способами. Выяснилось, что для непрерывной яйцекладки самки должны постоянно питаться и спариваться, иначе кладка прекращается, поэтому при наблюдении за самкой в прозрачной голодной среде значения яйцекладки были достоверно меньше, чем расчетные данные для культуры в фазе экспоненциального роста.

Сравнение состава культуры, начиная от момента удвоения числа самок и до достижения пика численности, позволяет сделать расчет плодовитости, разделив прирост общей численности за конкретный период на число самок на старте периода оценки.

$$F = [(N_{fin} - N_{start}) / N_{fem-s}] / T$$

F – суточная скорость яйцекладки одной самкой; N_{fin} – общая численность в конце периода счета, N_{start} – общая численность в начале периода счета, N_{fem-s} – число самок в начале периода счета, T – число дней (сут) периода счета.

Методики фитотестов.

Для определения независимой от переносчика специфичности нематод к растениям-хозяевам была разработана методика постановки лабораторных фитотестов на черенках с посадкой их в суглинистую почву (Ryss, Polyamina et al., 2018). Данные экспериментов обрабатывали с помощью дисперсионного однофакторного анализа (one-way Anova): с применением непараметрического Тьюки-теста (post-hoc Tukey HSD test) с предварительной нормализацией выборки методом степенной трансформации (BOX Cox transformation) (Sokal, Rohlf, 1995). Использованы программы Statistica 8.0 (Statsoft, 1984-2007) и MS Excel для оценки различий между выборками.

Глава 3 Результаты и обсуждение

3.1 Фауна и жизненные циклы ксилобионтных нематод ильмовых деревьев (*Ulmus laevis*, *U. glabra*)

В Таблице 3 представлен таксономический список фауны ксилобионтных нематод, обнаруженной в деревьях с выраженными симптомами Голландской болезни ильмовых. Даны их эколого-паразитологические группы по Поляниной и др. (2019) и гильдии (место в сукцессии детритной цепи и тип питания) по Феррису и др. (Ferris et al., 2001). Составлен атлас 15 обнаруженных видов нематод, даны текстовые диагностические ключи.

Энтомохорные облигатные виды патогенной ассоциации ГБИ. Обследования усыхающих деревьев (2014-2015 гг.) с признаками ГБИ на наличие ксилобионтной фауны позволили нам обнаружить два вида энтомохорных нематод, постоянно присутствующих в патогенной ассоциации короедов заболонников *Scolytus* spp. и больных деревьях сем. Ulmaceae. Один из видов был отнесен к роду *Bursaphelenchus* (*B. ulmophilus*, вид был описан как новый для науки).

Таблица 3 Обнаруженная фауна ксилобионтных нематод больных вязов

СЕМЕЙСТВО	ВИД	Переносчик	Эко-группа	Гильдия
ОТРЯД DORYLAIMIDA: ПОДОТРЯД DORYLAIMINA				
Dorylaimidae	<i>Mesodorylaimus brevicaudatus</i> Abolafia & Pena Santiago, 1996	-	Fl-Fu	Om4
ОТРЯД PLECTIDA: ПОДОТРЯД PLECTINA				
Plectidae	<i>Plectus acuminatus</i> Bastian, 1865	-	Fl-Ba	Ba2
ОТРЯД RHABDITIDA: ПОДОТРЯД RHABDITINA				
Rhabditidae	<i>Protorhabditis xylocola</i> (Körner, 1954) Osche in Dougherty, 1955	-	En-Int	Ba1, EPN
	<i>Diploscapter coronatus</i> Cobb, 1893	-	Fl-Ba	Ba1, Ca2
Diplogastridae	<i>Rhabditolaimus ulmi</i> T. Goodey, 1930	<i>Scolytus scolytus</i> , <i>S. multistriatus</i>	Ec-Co	Ba1
ОТРЯД RHABDITIDA: ПОДОТРЯД TYLENCHINA				
Panagrolaimidae	<i>Panagrolaimus scheucherae</i> Rühm, 1956	<i>S. scolytus</i> , <i>Taphrorychus bicolor</i>	Ec-Co	Ba1
Cephalobidae	<i>Chiloplacus</i> sp.	-	Fl-Ba	Ba2
Anguinidae	<i>Neoditylenchus</i> sp.	<i>Hylesinus</i> sp.	En-Hem-ad	EPN
	<i>Sychnotylenchus ulmi</i> Rühm, 1956	<i>S. scolytus</i>	En-Hem-ad	EPN
Aphelenchidae	<i>Aphelenchus avenae</i> Bastian, 1865	-	Fl-Fu	Fu2
Aphelenchoididae	<i>Aphelenchoides parasaprophilus</i> Sanwal, 1965	<i>Scolytus</i> sp.	Ec-Fup	Fup2
	<i>Laimaphelenchus deconincki</i> Elmiligy, Geraert, 1972	<i>S. multistriatus</i>	Fl-Fu	Fu2
	<i>Ektaphelenchus scolyti</i> Rühm, 1956	<i>S. multistriatus</i>	Ec-Ca	Ca2
	<i>Bursaphelenchus michalski</i> Tomalak, 2019	<i>Scolytus scolytus</i> ; <i>Scolytus jaroschewskii</i>	Ec-Fup	Fup2
	<i>Bursaphelenchus ulmophilus</i> Ryss, Polyanina , Popovichev, Subbotin, 2015	<i>Scolytus scolytus</i> , <i>S. multistriatus</i>	Ec-Fup	Fup2

Наряду с патогенной нематодой *B. ulmophilus* был обнаружен сопутствующий вид бактериотроф-комменсал *Rhabditolaimus ulmi* (Goodey, 1930; Rühm, 1956), который в 100 % случаев встречался как на жуке-переносчике, так и в древесных образцах. Пара этих видов-форонтов используют жуков *Scolytus* spp. для колонизации живых деревьев или для переноса на новые участки древесины для питания грибами или бактериями. Было изучено эмбриональное и постэмбриональное развитие обоих форонтов, выявлены дауер-личинки особого трансмиссивного поколения жизненного цикла (дауеры), детально исследована морфология видов с применением интерференционной, конфокальной микроскопии и СЭМ, выполнен филогенетический анализ.

Филогения *B. ulmophilus*. По результатам анализа последовательностей генов 18S, ITS и D2-D3 28S рРНК, новый вид *B. ulmophilus*, обнаруженный на больных Голландской болезнью деревьях, был отнесен к группе *Hofmanni* (Рисунок 3, 4). Выявлено, что на полученных по последовательностям D2-D3 28S и 18S рРНК деревьях виды группы *Hofmanni* из хвойных хозяев

сосуществуют с близкородственными видами из лиственных хозяев (Ryss et al., 2013, Ryss Polyana et al., 2015) (Рисунок 3). Эти данные по гостальной специфичности указывают на существование двух тенденций, идущих в противоположных направлениях: 1) переход от хвойных хозяев к лиственным хозяевам и 2) вторичный возврат к хвойным. Отсутствие строгой коэволюции видов группы *Hofmanni* с их растениями-хозяевами может быть объяснено их типом питания: нематоды участвуют в гибели большого дерева и затем размножаются в древесине отмирающих и мертвых деревьев. Таким образом, они не зависят от глубоких физиологических связей с живыми ослабленными растениями-хозяевами.

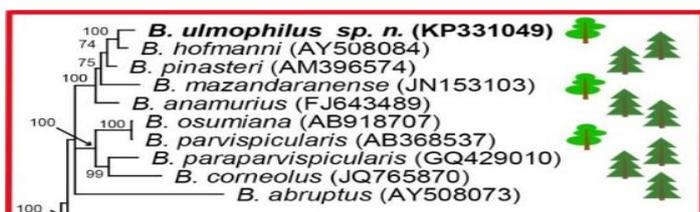


Рисунок 3 Растения-хозяева нематод группы *Hofmanni* (р. *Bursaphelenchus*). Смена хозяина: хвойные-лиственные-хвойные (по Ryss, Polyana et al., 2015). Филогения по последовательностям D2-D3 гена 28S рНК. Цветные значки – лиственные или хвойные хозяева нематод. (По Ryss, Polyana et al., 2015).

Филогения *R. ulmi*. Вид *R. ulmi* был проанализирован по последовательностям D2-D3 гена 28S рНК. Полученная последовательность была представлена в GenBank и сопоставлена с аналогичными последовательностями ДНК других *Rhabditolaimus* и родственных родов (Kanzaki, Giblin-Davis, 2014; Kiontke et al., 2007; Susoy, Herrmann, 2012, Susoy et al., 2015 и др.), консенсусное дерево В1, представлено на Рисунке 5, виды рода *Rhabditolaimus* образовали кладу с высокой поддержкой (PP = 100%).

Биология развития *B. ulmophilus* и *R. ulmi*. Нами обнаружено, что у *B. ulmophilus* и *R. ulmi* из яйца выходит личинка J2 стадии, преодолевая первую линьку внутри яйцевой оболочки. Отличием *R. ulmi* от *B. ulmophilus* является то, что половозрелые самки способны откладывать яйца на разных стадиях развития, в том числе с личинками J2 стадии внутри яйцевой оболочки, что не выявлено у *B. ulmophilus* (Рисунок 6).

Постэмбриональное развитие включает 4 стадии (J2-J4, половозрелые самцы и самки), разделенные линьками. Личиночные стадии каждого вида различаются между собой морфологией, размерами тела и полового зачатка. Идентифицировать пол личинки возможно, начиная со стадии J3. У личинок J4 различимы функциональные отделы половых зачатков (Рисунок 7).

Рост тела происходит быстрее, чем рост глотки. Увеличение размеров тела личинок происходит в ходе линек, но рост личинок продолжается также и внутри каждой стадии развития. Наибольший рост наблюдается между J3 и J4 стадиями, в этой же фазе значительно увеличивается половой зачаток и его клеточная дифференцировка (Рисунок 7, 8).

Обнаружено, что дауер-личинки обоих видов-фронтов по размерам тела и строению полового зачатка соответствуют J3 стадии развития пропативного поколения. Дауеры обоих видов на этапе нахождения на переносчике не питаются в силу редуцированности стомы и глотки.

Трансмиссивные личинки *B. ulmophilus* (гр. *Hofmanni*) – J3D, отличаются стадией развития от дауеров J4D гр. *Xylophilus*, к которой относится карантинная патогенная сосновая нематода *B. xylophilus*. Полученные результаты указывают на различие в стадиях трансмиссии между группами видов р. *Bursaphelenchus*.

Впервые обнаружено, что у нематод *R. ulmi* комбинированное питание: сочетание бактерио- и микотрофики. Нематоды могут питаться бактериями, которых они переносят на поверхности своего тела, также они способны питаться мицелием гриба *B. cinerea* в культуре. Новые данные расширяют спектр пищевых предпочтений *Rhabditolaimus* spp. (сем. Diplogastridae), которых экологи характеризуют как бактериотрофов (Yeates et al., 1993).

Проведенные нами исследования по локализации вида *R. ulmi* на жуке-переносчике и внутри растения-хозяина показали, что нематоды выполняют функцию дисперсии бактериальной и грибковой массы, находящейся на их слизистом чехлике. Дальнейшие исследования помогут оценить возможный вклад *R. ulmi* в патогенез Голландской болезни вязов, или же ее роль ограничивается комменсализмом на жуках-переносчиках ГБИ.

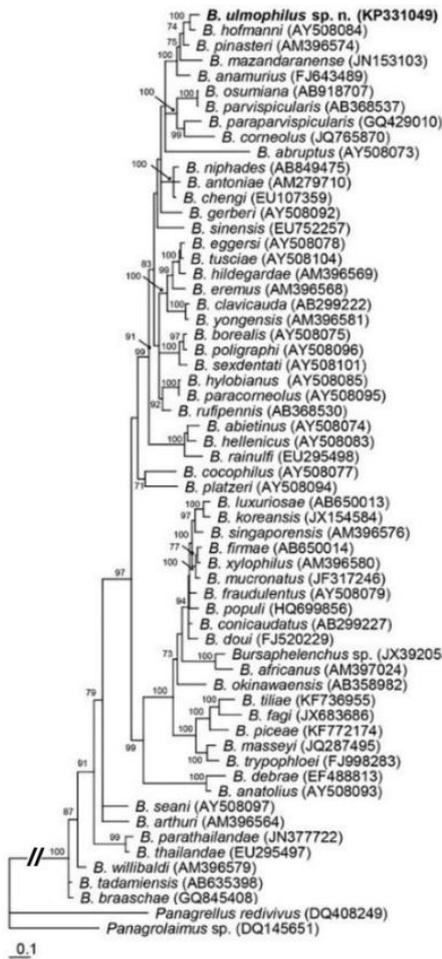


Рисунок 4 Байесово дерево, полученное при выравнивании D2-D3 28S рРНК нематод *Bursaphelenchus* spp. J3D и J4D – обозначения трансмиссивной стадии (дауер-личинки) (По Ryss, Polyamina et al., 2015).

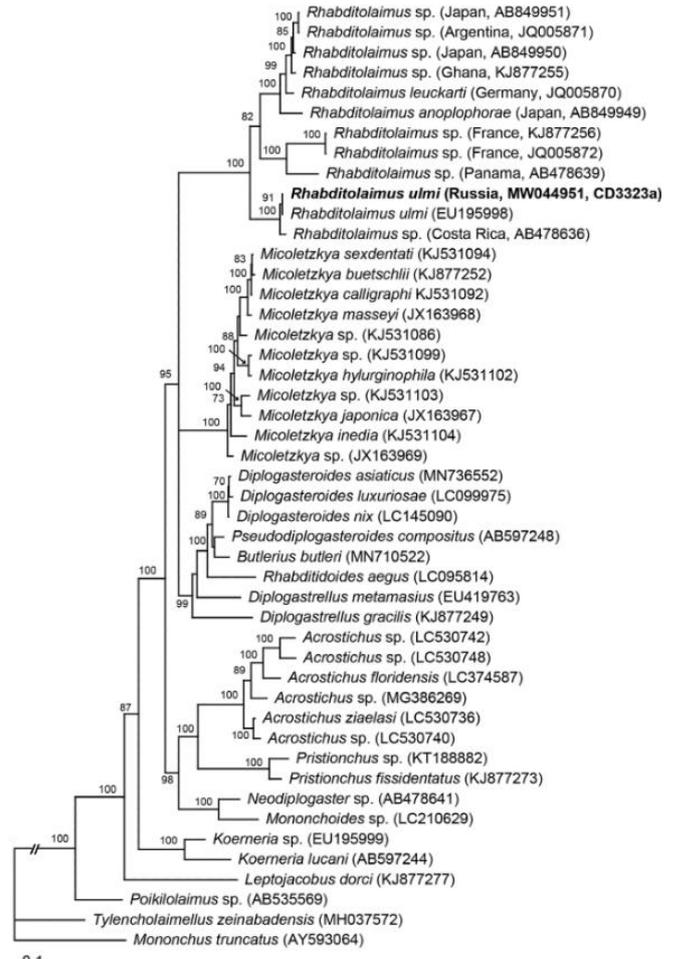


Рисунок 5 Байесово дерево, полученное при выравнивании D2-D3 28S рРНК нематод *Rhabditolaimus* spp. Для каждой клады указаны значения апостериорной вероятности (>70%). Новая последовательность выделена жирным шрифтом.



Рисунок 6 *Rhabditolaimus ulmi*: момент откладки яйца с личинкой J1 внутри

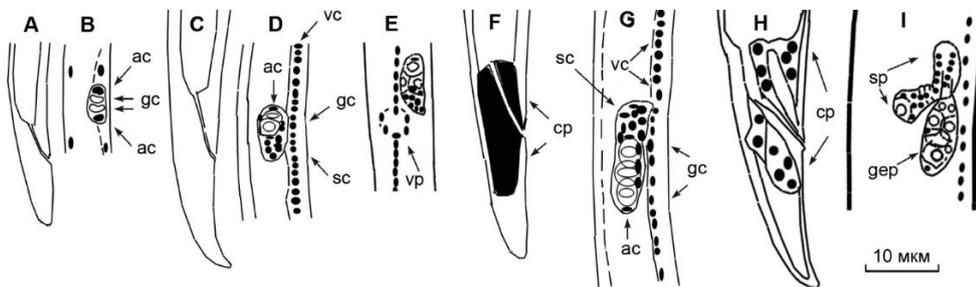


Рисунок 7 *B. ulmophilus*. Личинки. Хвосты (А, С, F, H); половые зачатки (В, D, Е, G, I). А, В – личинка 2 стадии; С, D, Е – личинка 3 стадии, самка (С, D – латерально; Е – вентрально); F, G – личинка самца 3 стадии; H, I – личинка самца, линька с 3 на 4 стадию (разворот соматической части). ac – апикальные клетки, ср – зачаток клоаки, gc – герминальные клетки, гер – герминальная часть зачатка, sc – соматические клетки, sp – соматическая часть полового зачатка, vc – вентральный тяж ядер гиподермальных клеток, vp – зачаток вульвы.

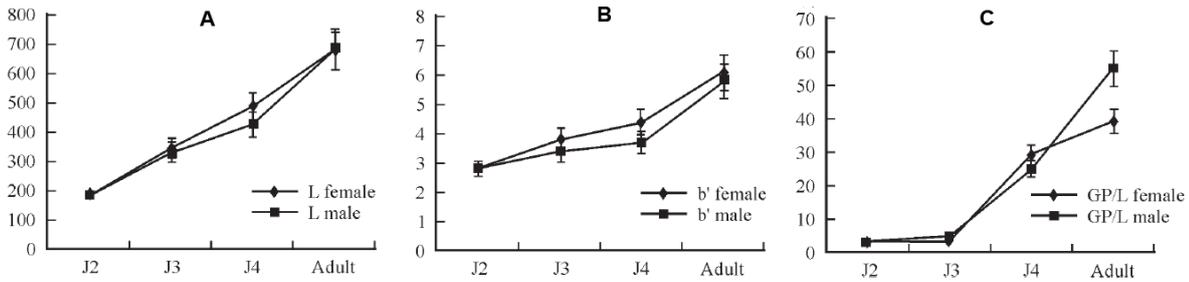


Рисунок 8 Диаграммы роста личинок *B. ulmophilus*. А — длина тела, В — отношение длины тела к длине глотки (b'), С — отношение длины полового зачатка к длине тела (GP/L, %). Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение средних значений

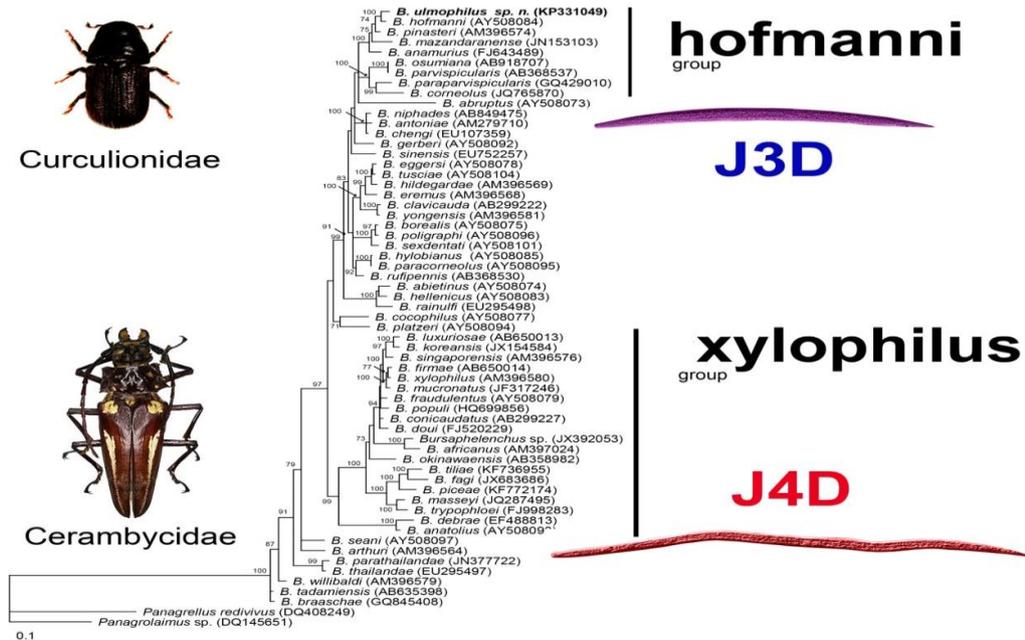


Рисунок 9 Отличия трансмиссивных стадий групп видов *Hofmanni* (дауер-личинка J3D) и *Xylophilus* (дауер-личинка J4D)

Заклучение по разделу. Ассоциация патогенов ГБИ включает в себя не только грибы рода *Ophiostoma* и жуков-короедов рода *Scolytus*, как это было известно ранее, но и фитопатогенных нематод рода *Bursaphelenchus* и энтомохорных бактериотрофов из рода *Rhabditolaimus* – комменсалов жуков-переносчиков. В последующих главах представлены результаты экспериментальных исследований по онтогенезу этих видов, их популяционной динамике и специфичности к растениям-хозяевам (фитотесты). У представителей рода *Bursaphelenchus* личинки особого трансмиссивного поколения, относящиеся к разным филогенетическим группам, отличаются друг от друга стадией развития, это обусловлено специфичностью нематод к разным семействам переносчиков. Публикации по разделу: Ryss, Polyanina et al., 2015; Ryss, Polyanina, 2017; 2022b; 2022d; Ryss, Polyanina et al., 2021; тезисы: Ryss A.Y., Polyanina K.S., 2015a; 2015b; Polyanina et al., 2016; Ryss, Polyanina, 2017; Ryss, Polyanina et al., 2018; Polyanina, Ryss, 2019; 2020; Полянина, Рысс, 2021; 2022; Рысс, Полянина, 2022.

3.2 Фауна и жизненные циклы ксилобионтных нематод ясеня *Fraxinus excelsior* с симптомами суховершинности

В Таблице 4 представлены виды фауны ксилобионтных нематод *Fraxinus excelsior*, обнаруженной в деревьях с симптомами суховершинности. Среди 11 видов нематод, 7 видов энтомохорные; из них впервые обнаружен в России вид фитопатогенного рода *Bursaphelenchus*, облигатный ассоциант симптомов суховершинности ясеня – *B. crenati*. Для обнаруженных видов даны диагностические ключи и составлен атлас фотоиллюстраций. Облигатным ассоциантом флоэмы больных ясеней в России и Беларуси оказался вид патогенного рода *Bursaphelenchus crenati*. Изучены морфология и жизненный цикл *B. crenati*, включая трансмиссивную стадию (дауер-личинку).

Филогения *B. crenati*. Вид *B. crenati* был проанализирован по тем же молекулярным маркерам, что и *B. ulmophilus*. Исследованные последовательности ДНК белорусской и

российской популяций *B. crenati* были идентичны друг другу, вид отнесен к группе *Sexdentati* по морфологическим и молекулярным признакам.

Биология развития *B. crenati*. Впервые изучен онтогенез *B. crenati*, выявлены и описаны дауер-личинки трансмиссивного поколения, дана морфологическая и молекулярная характеристики вида. В процессе морфологических и молекулярных исследований вид был идентифицирован как относящийся к группе видов *Sexdentati* (Рисунок 10). Вид переописан, разработан новый дифференциальный диагноз от филогенетически близких видов рода *Bursaphelenchus*.

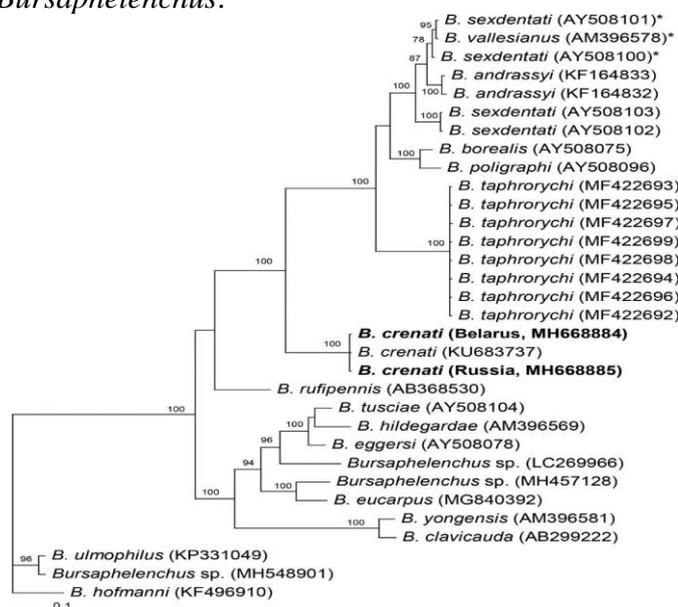


Рисунок 10 Байесово дерево, полученное при выравнивании фрагментов D2-D3 28S рРНК нематод *Bursaphelenchus* из группы *Sexdentati*. Значения апостериорной вероятности (более 70 %) даны в процентах для каждой клады. Новые последовательности выделены жирным шрифтом. *— видовая принадлежность этих последовательностей требует подтверждения (Ryss, Polyana et al., 2019)

Таблица 4 Обнаруженная фауна ксилобионтных нематод больных ясеней

СЕМЕЙСТВО	ВИД	Переносчик	Эко-группа	Гильдия
ОТРЯД DORYLAIMIDA: ПОДОТРЯД DORYLAIMINA				
Dorylaimidae	<i>Eudorylaimus</i> sp.	-	Fl-Fu	Om4
ОТРЯД TRIPLONCHIDA: ПОДОТРЯД DIPHTEROPHORINA				
Diphterophoridae	<i>Tylolaimophorus bulgaricus</i> Andrassy, 1958	-	Fl-Fu	Fu3
ОТРЯД RHABDITIDA: ПОДОТРЯД RHABDITINA				
Rhabditidae	<i>Parasitorhabditis ateri</i> (Fuchs, 1915) <i>Dougherti</i> , 1955	<i>Hylastes</i> sp.	En-Int	Ba1, EPN
Diplogastridae	<i>Acrostichus pterygatus</i> (Timm 1961) Massey 1966	<i>Hylastes</i> sp.	Ec-Co	Ba1
	<i>Rhabditolaimus leuckarti</i> Fuchs, 1915	<i>Scolytus scolytus</i> , <i>S. multistriatus</i>	Ec-Co	Ba1
ОТРЯД RHABDITIDA: ПОДОТРЯД TYLENCHINA				
Cephalobidae	<i>Cephalobus persegnis</i> Bastian, 1865	-	Fl-Ba	Ba2
Panagrolaimidae	<i>Panagrolaimus leperisini</i> Massey, 1974	<i>Scolytus</i> sp.	Ec-Co	Ba1
Aphelenchoididae	<i>Aphelenchoides parasaprophilus</i> Sanwal, 1965	<i>Scolytus</i> sp.	Ec-Fup	Fup2
	<i>Laimaphelenchus penardi</i> Steiner, 1914	-	Fl-Fu	Fu2
	<i>Bursaphelenchus crenati</i> Rühm, 1956	<i>Hylesinus crenatus</i>	Ec-Fup	Fup2
	<i>Bursaphelenchus zvyagintsevi</i> Ryss & Subbotin, 2023	<i>Hylesinus laticollis</i>	Ec-Fup	Fup2

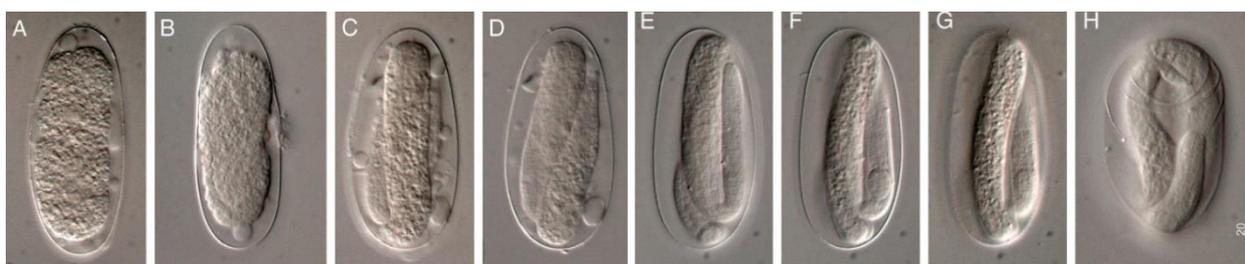


Рисунок 11 *B. crenati*. Развитие в яйце. А – дробление; В – гастрюляция; С, D – личинка первой стадии (J1) в яичной скорлупе; Е, F, G – Личинка второй стадии в момент линьки (J2) с отслоившейся кутикулой; Н – вылупление J2, подготовка к выходу из яичной скорлупы. Шкала 20 мкм

Обнаружено, что постэмбриональное развитие *B. crenati* включает в себя 4 стадии (J2-J4, половозрелые самцы и самки), разделенные линьками. Личинка J2 выходит из яйца после первой линьки внутри яичевой оболочки (Рисунок 11). Личиночные стадии различаются между собой строением и размерами полового зачатка. Идентификация пола личинок также возможна начиная со стадии J3. У личинок J4 различимы функциональные отделы половых зачатков.

Обнаруженные дауер-личинки *B. crenati* идентичны по строению полового зачатка личинкам J3 пропативного поколения, дауеры способны быстро линять на стадию J4D при погружении их в воду в течение 3 часов. Из-за редуцированной глотки и стомы дауер-личинки не могут питаться.

Заключение по разделу. По симптомам суховершинности ясеня, наблюдаемым у зараженных деревьев при сборе образцов, локализации нематоды в флоэме и ходах короедов, и специфичности к природному растению-хозяину (раздел 3.5), можно сделать вывод, что *B. crenati* – умеренно патогенный облигатный паразит ясеня. Эксперименты, о которых говорится в разделе 3.5 при участии *B. crenati* выявили независимую от переносчика специфичность данного вида нематоды к своему растению-хозяину. По результатам нашего исследования впервые доказано, что нематоды *B. crenati* являются паразитами и оппортунистическими патогенами ясеня *F. excelsior*. Эти нематоды могут быть синергистами двух сопутствующих важных патогенов: гриба *Chalara fraxinea* и жука-златки *Agrilus planipennis*, связанных с симптомами суховершинности ясеня в России и Беларуси. Публикации по разделу: Ryss, Polyana, 2018; Ryss, Polyana et al., 2018a; тезисы совещания Полянина и др., 2018.

3.3 Фауна и жизненные циклы ксилобионтных нематод дуба (*Quercus robur*) с симптомами вилта

В ходе обследований насаждений дуба с признаками вилта на наличие ксилобионтной фауны нами были обнаружены 20 видов нематод, четыре из которых относятся к роду *Bursaphelenchus*: *B. fraudulentus*, *B. willibaldi*, *B. laciniatae*, *B. eremus*.

Обнаруженная фауна ксилобионтных нематод представлена в виде Таблицы 5, атласа и диагностических ключей. По типу питания (фито-микопаразиты) и способности к энтомохории (трансмиссии насекомым-переносчиком), а также таксономической близости к известным паразитическим родам *Bursaphelenchus* и *Aphelenchoides* для дальнейшего углубленного исследования жизненных циклов выбраны три вида этих родов.

Изучена морфология и построена филогения модельных видов на основе анализа молекулярных маркеров. Нами также были исследованы все стадии онтогенеза на примере вида *B. fraudulentus* (Рисунок 12), а для *B. willibaldi* и *Aphelenchoides* cf. *eldaricus* изучены стадии онтогенеза, основные параметры жизненного цикла (сроки линек, плодовитость, период фертильности и продолжительность жизни самки) и популяционная динамика *in vitro* и построены математические модели размножения этих нематод в 1 м³ дерева-хозяина (раздел 3.4). Эмбриональное и постэмбриональное развитие *B. fraudulentus* схоже с ранее изученными видами *B. ulmophilus* и *B. crenati*. Постэмбриональное развитие включает 4 стадии (J2-J4, половозрелые самцы и самки), разделенные линьками. Личиночные стадии различаются между собой морфологией, размерами тела и полового зачатка. Идентифицировать пол личинки возможно начиная со стадии J3. У личинок J4 различимы функциональные отделы половых зачатков.

Таблица 5 Обнаруженная фауна ксилобионтных нематод больных дубов

СЕМЕЙСТВО	ВИД	Переносчик	Эко-группа	Гильдия
ОТРЯД MONHYSTERIDA: ПОДОТРЯД MONHYSTERINA				
Monhysteridae	<i>Geomonhystera villosa</i> (Bütschli, 1873) Andrassy, 1981	-	Fl-Ba	Ba2
ОТРЯД MONONCHIDA: ПОДОТРЯД MONONCHINA				
Anatonchidae	<i>Anatonchus</i> sp.	-	Fl-Ca	Ca4
ОТРЯД PLECTIDA: ПОДОТРЯД PLECTIDA				
Plectidae	<i>Plectus makrodemas</i> Massey, 1964	-	Fl-Ba	Ba2
ОТРЯД RHABDITIDA: ПОДОТРЯД RHABDITINA				
Rhabditidae	<i>Mesorhabditis irregularis</i> (Korner in Osche, 1952) Dougherty, 1955	<i>Scolytus intricatus</i>	En-Int	Ba1, EPN
Diplogastridae	<i>Acrostichus</i> sp	<i>Scolytus intricatus</i>	Ec-Co	Ba1
ОТРЯД RHABDITIDA: ПОДОТРЯД TYLENCHINA				
Panagrolaimidae	<i>Panagrellus ventrodentatus</i> (Weingartner, 1954) Goodey, 1963	<i>Scolytus intricatus</i>	Ec-Co	Ba1
	<i>Panagrolaimus rigidus</i> (Schneider, 1866) Thorne, 1937	Cerambycidae	Ec-Co	Ba1
Tylenchidae	<i>Filenchus uliginosus</i> (Brzeski, 1977) Raski & Geraert, 1987	-	Fl-Fup	Fu2
Sphaerulariidae	<i>Hexatyclus pseudoobtusus</i> (Rühm, 1956) Chizhov, Butorina, Tabolin, Limantseva & Subbotin, 2019	<i>Scolytus intricatus</i>	Fup-EPN	Fup
Aphelenchoididae	<i>Aphelenchoides composticola</i> Franklin, 1957	-	Ec-Fup	Fup
	<i>Aphelenchoides eldaricus</i> Esmaeili, 2017	<i>Scolytus</i> sp.	Ec-Fup	Fup2
	<i>Laimaphelenchus hyrcanus</i> Miraeiz, 2015	-	Fl-Fu	Fu2
	<i>Laimaphelenchus heidelbergi</i> Zhao, 2007	-	Fl-Fu	Fu2
	<i>Laimaphelenchus penardi</i> (Steiner, 1914) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941	-	Fl-Fu	Fu2
	<i>Laimaphelenchus pannocaudus</i> Massey, 1966	-	Fl-Fu	Fu2
	<i>Ektaphelenchus</i> sp.	<i>Scolytus</i> sp.	Ec-Ca	Ca2
	<i>Bursaphelenchus eremus</i> Rühm, 1956	<i>Scolytus intricatus</i> , <i>Plagiontus</i> sp.	Ec-Fup	Fup2
	<i>Bursaphelenchus fraudulentus</i> Rühm, 1956 (Goodey, 1960)	<i>Trypophloeus granulatus</i> , <i>Cerambyx scopolii</i>	Ec-Fup	Fup2
	<i>Bursaphelenchus laciniatae</i> Kanzaki, 2019	<i>Scolytus</i> sp.	Ec-Fup	Fup2
	<i>Bursaphelenchus willibaldi</i> Schoenfeld, Braasch & Burgermeister, 2006	<i>S. intricatus</i>	Ec-Fup	Fup2

Филогения *B. fraudulentus* показана на Рисунках 4 и 13, а для *B. willibaldi* и *Aphelenchoides* cf. *eldaricus* на Рисунке 13.

Заключение по разделу. Фауна нематод больного дуба наиболее богата видами и экологическими группами нематод. Она включает энтомохорные оппортунистические патогенные виды родов *Bursaphelenchus* и *Aphelenchoides*, обладающих разными стадиями трансмиссии и выживания, от личинок J3 и J4 до оплодотворенных самок. Филогенетические исследования показали принадлежность видов р. *Bursaphelenchus* к группам *Xylophilus* (*B. fraudulentus*), *Eggersi* (*B. eremus*) и *Fungivorus* (*B. willibaldi*). Все эти виды обнаружены в России и Беларуси впервые, в ходе переописания выявлены новые признаки, впервые получены последовательности их генов (D2-D3 гена 28S рРНК), а их биология и специфичность экспериментально исследованы в последующих разделах 3.4 и 3.5. Публикации по разделу: Ryss, Polyana, 2022a; 2022c; тезисы: Ryss, Polyana, 2017; 2018; Polyana, Ryss, 2019.

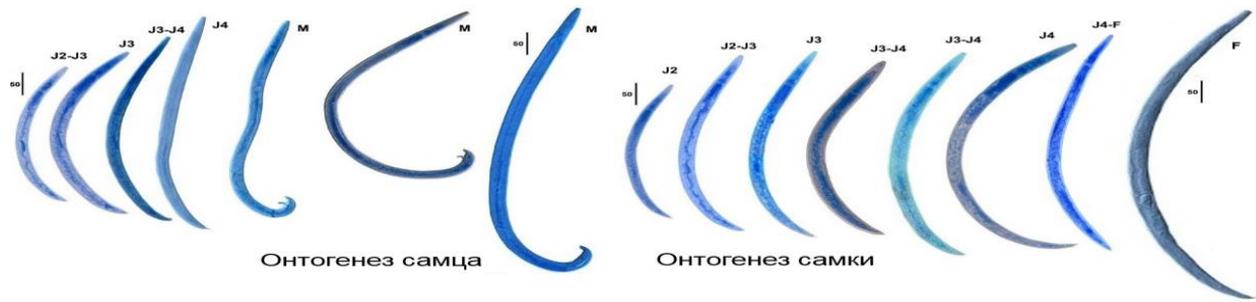


Рисунок 12 *B. fraudulentus*. Стадии индивидуального развития: слева развитие самца, справа развитие самки, J2, J3, J4 - стадии 2,3,4 личинок, J2-J3, J3-J4 и т.д. – линьки; М – самец; F – самка. Шкала 50 мкм

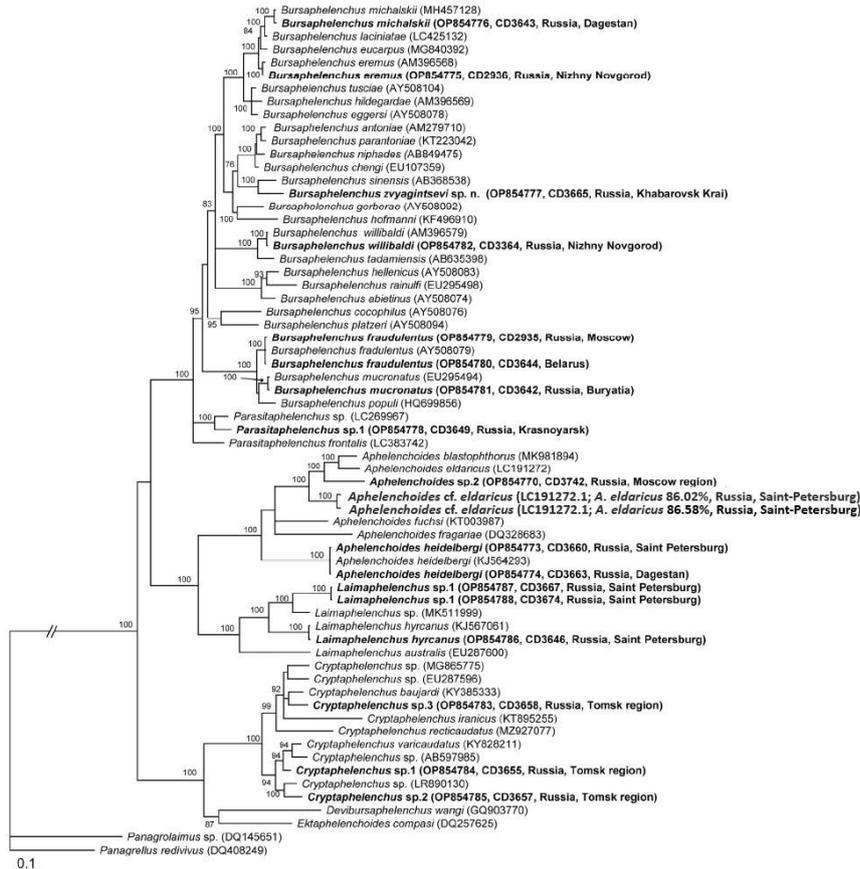


Рисунок 13 Филогенетическое положение *B. fraudulentus*, *B. willibaldi* и *Aphelenchoides* cf. *eldaricus* среди некоторых представителей надсемейства Aphelenchoidea (Tylenchina) по результатам Байесова анализа D2-D3 последовательностей гена 28S рРНК. Значения последовательностей с вероятностью более 70% указаны для соответствующих клад. Новые последовательности выделены жирным шрифтом. (Ryss, Subbotin, 2023)

3.4 Биология развития и популяционные модели нематод разной трофической специализации

В данной главе впервые предложен подход к изучению и оценке основных параметров жизненного цикла и популяционного цикла *in vitro* на примере модельных видов ксилобитных нематод.

Нами были исследованы 4 модельных вида ствольных нематод отряда Rhabditida, связанных с жуками-переносчиками: 2 вида, относящихся к бактериотрофам, – *Panagrolaimus detritophagus* сем. Panagrolaimidae, *Rhabditolaimus ulmi* сем. Diplogastridae и 2 вида фито-микотрофов сем. Aphelenchoididae, совмещающих фитопаразитизм и микотрофику на разных стадиях цикла, – *Bursaphelenchus willibaldi* и *Aphelenchoides* cf. *eldaricus*. (Таблица 6, 7, Рисунок 15). Экспериментально определены параметры онтогенеза: плодовитость, сроки фаз: яйцекладки, выход личинок из яйца, линек, время одной генерации, продолжительность жизни и фертильный период самок. Эти параметры достоверно отличались между видами и между разными экогруппами нематод. Средняя продолжительность онтогенеза (1G) изученных видов от 4 сут до 12 сут; средняя плодовитость от 1.3 до 3.6 яиц/сут. Продолжительность репродуктивного периода самок варьирует от 1G до 9G (G – время генерации яйцо-яйцо, или оплодотворенная самка-самка второго поколения). Фито-микотрофы отличаются от бактериотрофов наличием миграционной группы, покидающей агаровую среду через 1-2G и служащей для пассивного или энтомохорного расселения в новые среды.

Цикл популяции начинается экспоненциальным ростом численности нематод (Рисунок 14; пример: *R. ulmi*, изменения общей численности червеобразных стадий в популяционном цикле *in vitro*). Для этой фазы сгенерирована экспоненциальная математическая модель, позволяющая рассчитать сроки заселения нематодами и биоразложения 1 м³ древесино-подобного субстрата (агаровая среда КСА, по концентрациям пищевых компонентов – сахаров и крахмалов – идентичная древесине живого дерева, Chow et al., 2004) при температуре 22 °С (*in vitro*), а затем аппроксимировать эти данные для экосистемы естественного ландшафта по климатическим характеристикам. Мы рассчитали, что сроки заселения 1 м³ субстрата и его декомпозиции составляют от 1 года до 4 лет для древесных растений-хозяев в регионах умеренного климата.

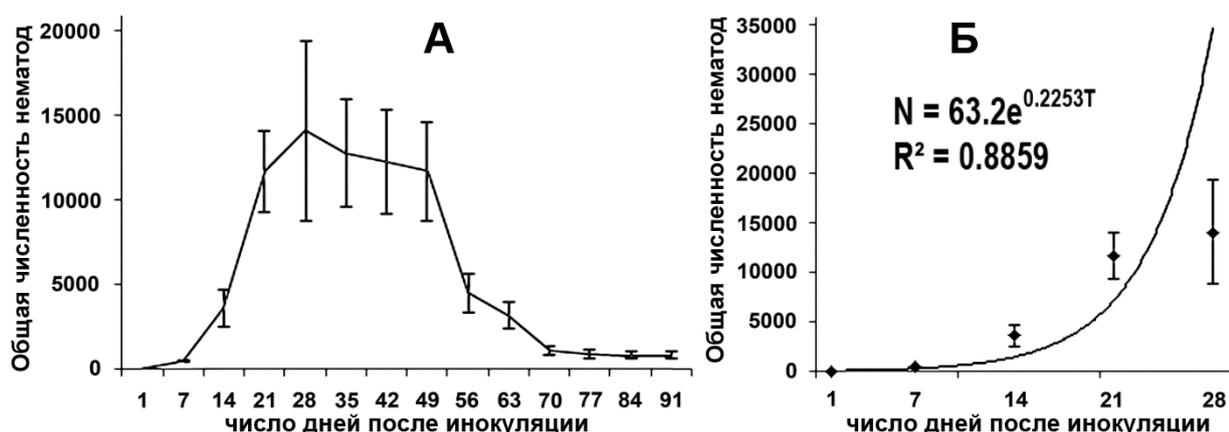


Рисунок 14 *Rhabditolaimus ulmi* (бактериотроф). А - Динамика численности в популяционном цикле *in vitro* при инокуляции 50 половозрелыми нематодами; Б - кривая периода экспоненциального роста (28 сут); в экспоненциальной формуле: N – общая численность, T – число дней после инокуляции, $p < 0.05$

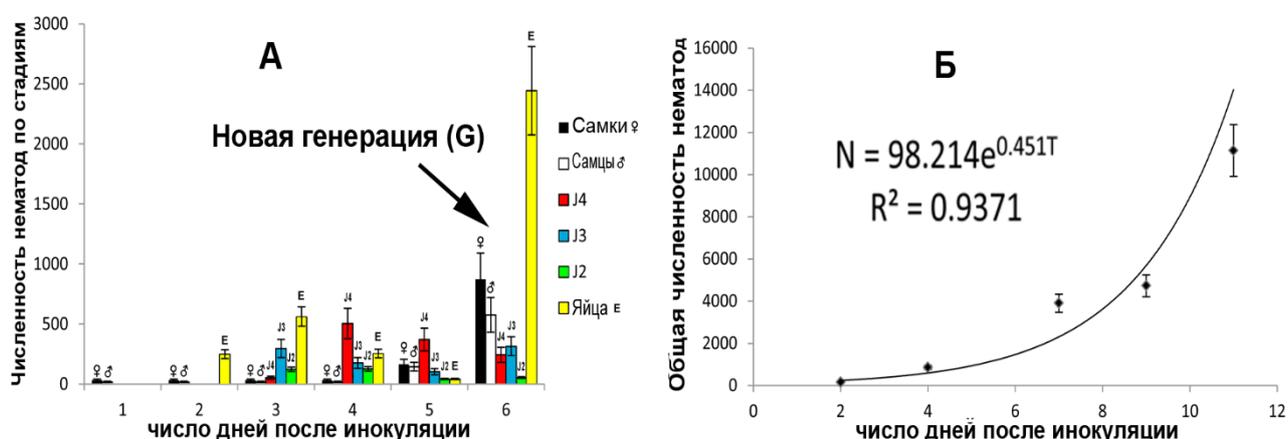


Рисунок 15 *B. willibaldi* (фито-микотроф). Динамика (А) и экспоненциальная модель 1-3 генерации (Б)

Таблица 6 Сроки стадий онтогенеза (сут) *B. willibaldi* и *R. ulmi*. Формат данных: ср.знач ± стандартное отклонение (диапазон). Инокулюм 50 взрослых особей в обычном соотношении самки: самцы, *B. willibaldi*: 32:18; *R. ulmi*: 30:20

	<i>B. willibaldi</i>		<i>R. ulmi</i>	
	n	Сроки и число яиц	n	Сроки и число яиц
Старт яйцекладки	18	2.7 ± 0.5 (1-3)	693	1.07 ± 0.25 (1-2)
Личинка J2	32	3.2 ± 0.5 (3-4)	399	2.56 ± 0.53 (2-4)
Личинка J3	32	3.6 ± 0.8 (3-5)	290	3.70 ± 0.96 (3-5)
Личинка J4	58	4.8 ± 0.9 (3-6)	237	6.01 ± 0.67 (5-9)
Генерация G-♀	70	5.8 ± 0.5 (4-6)	89	7.83 ± 1.32 (7-10)
Генерация G-♂	60	5.8 ± 0.5 (4-6)	82	7.98 ± 1.38 (7-10)
Плодовитость (F), яиц / сут	10	3.4 ± 1.5 (2.1-5.9)	10	2.80 ± 1.82 (1.11-6.06)

Таблица 7 Основные параметры жизненных циклов 4 видов нематод

	<i>P. detritophagus</i>	<i>R. ulmi</i>	<i>Aphelenchoides</i> cf. <i>eldaricus</i>	<i>B. willibaldi</i>
Трофическая специализация	бактериотроф	бактериотроф	мико-фитотроф	мико-фитотроф
n*	20	20	20	20
Онтогенез (1-я генерация)	7.3 ± 0.8 (6-8)	7.83 ± 1.32 (7-10)	10.5 ± 1.5 (9-11)	5.8 ± 0.5 (4-6)
Популяционный цикл, сут	34	70 – 91	63	63
Наличие переносчика	факультативно	да	нет	да
Суточная плодовитость в первом поколении	4.5 ± 1.3 (3-6)	2.80 ± 1.82 (1.11-6.06)	1.32 ± 0.63 (0.51-2.28)	3.4 ± 1.5 (2.1-5.9)
Стадия диапаузы <i>in vitro</i>	яйцо, J3	J3	Самка (со спермиями)	J4
Наличие энтомохорной дауер-личинки	не известно	J3D	не известно	J3D
Наличие миграционной группы 2-го и последующих поколений	нет	нет	да	да
Продолжительность жизни самки, сут	13 – 20	56 – 59	33 – 44	18 – 40
Время заселения 1 м ³ древесины хозяина **	20.2 сут, или 1 г.	76.9 сут или 2-3 г.	97 сут или 4 г.	37 сут или 1-2 г.

*) n= число чашек Петри, по которым сделан перерасчет соответствующих параметров для одной самки (среднее значение ± стандартное квадратичное отклонение, минимум-максимум).

**) Рассчитана по формуле экспоненциального роста популяций нематод *in vitro* (достижения пика численности при занятии объема среды с близкими концентрациями питательных веществ).

Заключение по разделу. Впервые на четырех модельных видах стволовых нематод, входящих в патогенные ассоциации «нематода-насекомое-грибы-бактерии», убивающие древесные растения и разрушающие древесину, выявлены параметры онтогенеза патогенов с одновременным количественным анализом и моделированием их популяционного цикла *in vitro*. В результате изучения циклов 4 видов нематод (2 бактериотрофа и два фито-микопаразита в каждой трофической паре один энтомохорный, и один с простым циклом без переносчика) впервые реализован пошаговый подход одновременного изучения параметров динамики популяций и сроков различных фаз жизненного цикла: время одной генерации от яйца до яйца; продолжительность популяционного цикла в условиях первоначального изобилия пищи; сроки линек; суточная плодовитость самок; стадии диапаузы и дисперсии пропативного поколения; наличие энтомохорной трансмиссивной личинки и её отличие от пропативной дисперсионной стадии; способность к формированию миграционной группы у фито-микотрофов как завершающей фазы жизненного цикла; фертильный период и общая продолжительность жизни самок; пики численности субстратной и мигрирующей (трансмиссивной) части популяции. Показано, что по завершении популяционного цикла нематоды формируют клубки-агрегации из особей стадии выживания (диапаузы). Построены экспоненциальные модели роста популяции на этапе заселения субстрата и на основании параметров этих моделей выявлены сроки, необходимые для заселения и разложения 1 м³ древесины модельными видами нематод и их симбионтами (бактериями и грибами). Результаты исследования позволят в будущем создать модели потоков биомассы и энергии через популяции нематод в детритной экосистеме леса. Сравнительный анализ циклов модельных видов впервые выявил существенные отличия 4 патогенных видов в стадиях выживания и трансмиссии (яйца, или личинки 3 или 4 стадии, или осемененные самки), плодовитости и времени генерации, как критериев специализации в системе паразит-хозяин и паразит-переносчик. Публикации по разделу: Polyanina, Ryss, 2021; Ryss, Polyanina, 2022a; 2022b; 2022c.

3.5 Отношения паразит-хозяин: фитотесты

Нематоды рода *Bursaphelenchus* карантинного значения привлекают к себе повышенное внимание исследователей в связи с постоянным экспортом леса и перевозкой больших объемов древесины. Предложены новые подходы к выявлению наличия у нематод рода *Bursaphelenchus* независимой от предпочтений жуков-переносчиков специфичности к природным растениям-хозяевам. Разработанная методика постановки лабораторных тестов была апробирована на трех

видах нематод рода *Bursaphelenchus* принадлежащих к разным филогенетическим группам: *B. mucronatus* (гр. *Xylophilus*), *B. crenati* (гр. *Sexdentati*) и *B. ulmophilus* (гр. *Hofmanni*). Результаты тестов представлены на Рисунке 16 на примере вида *B. mucronatus*.

Основываясь на результатах фитотестов можно говорить о собственной специфичности видов рода *Bursaphelenchus* к природному растению-хозяину, независимой от переносчика.

Обнаружено, что сосновая нематода *B. mucronatus* хорошо размножается только на природном растении-хозяине – *P. sylvestris*, а также обладает собственными адаптациями к преодолению иммунных барьеров природного растения-хозяина.

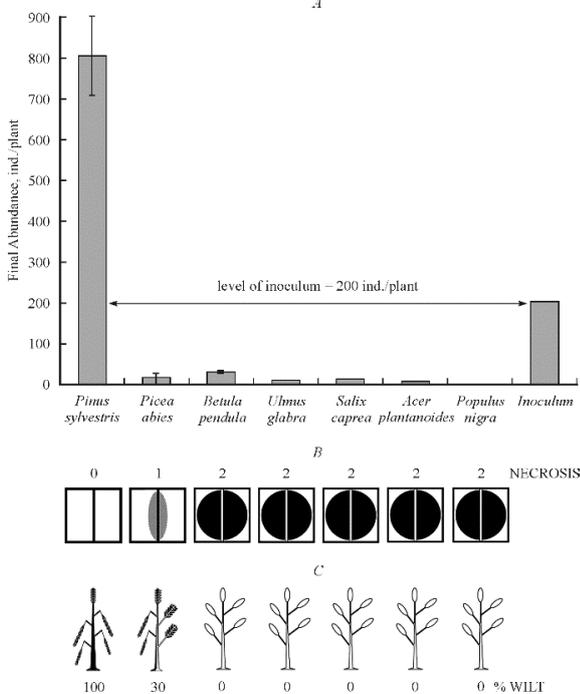


Рисунок 16 *B. mucronatus*. Тест на патогенность и специфичность круга хозяев. А: ось ординат: финальная численность нематод на растение; ось абсцисс: растения-хозяева. Горизонтальная линия со значением 200 маркирует величину инокулята (200 особей на растение). Планки погрешностей обозначают стандартные отклонения для каждого среднего значения финальной численности нематод на один саженец ($n = 20$); В: иммунная реакция; С: степень вилта. По: Ryss, Polyanina et al., 2018

В эксперименте с *B. ulmophilus* обнаружено, что нематода способна размножаться не только на природном растении-хозяине – *U. glabra*, но и на других видах деревьев: *P. nigra*, *P. sylvestris*, *L. decidua*, *A. sibirica* и *Q. robur*.

Финальная численность *B. crenati* в эксперименте демонстрирует успешное размножение нематод на природном растении-хозяине *F. excelsior*, а также на *P. sylvestris*, *U. glabra* и *P. nigra*. Можно сделать вывод, что виды *B. ulmophilus* и *B. crenati* специфичны к природному растению-хозяину, а не только к виду переносчика. Однако в отличие от *B. mucronatus*, эти виды способны размножаться и на других растениях, которые не являются природными хозяевами и могут выступать эффективными резервуарными хозяевами. Это означает, что существует опасность становления новых патогенных систем паразит-хозяин при появлении подходящего инвазивного переносчика, способного доставить личинок нематод к резервуарному хозяину.

Заключение по разделу. Экспериментально доказано, что паразитические виды *Bursaphelenchus* обладают статистически достоверной специфичностью к своему природному растению-хозяину. Это дополняет представления о специфичности паразитов: до сих пор филогению бурсафеленхов по молекулярным данным обосновывали только предпочтениями переносчиков нематод на уровне рода, а умирающее растение-хозяин считали субстратом для второго хозяина нематод – мицелия фитопатогенного гриба. Тот факт, что некоторые патогенные виды способны быстро размножиться в видах растений, которые не служат природными хозяевами, указывает на риск становления новых патогенных систем паразит-хозяин на основе скрытых резервуарных хозяев и нового инвазивного переносчика.

Публикации по разделу: Ryss, Polyanina et al., 2018b; тезисы: Рысс, Полянина, Скрыбина, 2018.

Заключение (общее)

Недостаточная изученность фитогельминтов важнейших коммерческих и декоративных видов лиственных деревьев предопределила направление нашего исследования. По степени связи с переносчиками выделены экогруппы стволовых нематод; для каждого вида дерева определены как потенциальные агенты трансмиссивных эпифитотий, так и комменсалы, а также виды-

антагонисты насекомых, которых в перспективе можно использовать для биоконтроля переносчиков. Потенциально наиболее опасными для растений являются виды патогенного рода *Bursaphelenchus*. Показано, что разные филетические линии (группы видов) *Bursaphelenchus* используют разные трансмиссивные стадии (дауров) для своего энтомохорного распространения, что обусловлено их адаптациями к разным семействам переносчиков.

В ходе исследования выявлены новые молекулярные признаки. Использование методов световой, лазерной (конфокальной) микроскопии и СЭМ, позволило выявить важные новые признаки (паттерны папилл переднего отдела и каудального хвоста самца, половые мышцы и их гомологии, строение половой системы нематод и варианты морфогенеза полового зачатка у личинок разных полов нематод). Показаны существенные отличия (редукции) в строении глотки у трансмиссивных стадий паразитов (*Bursaphelenchus*) и комменсалов (*Rhabditolaimus*).

В ходе экспериментов *in vitro* впервые реализован пошаговый подход одновременного изучения параметров динамики популяций, и определены сроки ключевых фаз жизненного цикла: время одной генерации; сроки линек; суточная плодовитость самок; стадии диапаузы и дисперсии пропативного поколения; наличие энтомохорной трансмиссивной личинки и её отличие от пропативной дисперсионной стадии; продолжительность жизни самок, продолжительность популяционного цикла в условиях первоначального изобилия пищи; способность к формированию миграционной группы дисперсии.

Впервые установлено, что динамика популяций включает первоначальную фазу экспоненциального роста, а после достижения пика численности происходит медленное угасание популяции за счет интенсивной миграции стадий дисперсии и выживания, а также за счет прекращения репродукции и смертности самок. Это дало возможность впервые построить экспоненциальные математические модели роста популяции в зависимости от времени, и выявить сроки, необходимые для заселения 1 м³ древесины модельными видами нематод и их симбионтами (бактериями и грибами).

В ходе фитотестов *in vitro* впервые экспериментально доказано, что виды рода *Bursaphelenchus* могут иметь собственную специфичность к природному растению-хозяину, которая не обусловлена предпочтениями переносчика.

Углубленное исследование жизненных циклов нематод рода *Bursaphelenchus* впервые дало возможность понять, почему именно представители этого рода потенциально опасны для деревьев. Эти виды входят в патогенные ассоциации, где участвуют как насекомые-переносчики, так и грибы и бактерии, которых переносят как сами переносчики, так и сами энтомохорные нематоды, распространяющие микроорганизмы по стволу зараженного дерева. Именно поэтому заселение ослабленного климатическими факторами (засуха менее 600 мм осадков/год, температура воздуха 20 °C и выше) растения-хозяина патогенной ассоциацией предполагает сумму действий всех членов ассоциации, выступающих как взаимные синергисты, вносящие свой вклад в гибель дерева. Патогенность нематод в данном процессе оппортунистическая, поскольку связана с другими организмами патогенной ассоциации, где в случае лиственных деревьев часто нет главного патогена. Однако при сочетании неблагоприятных условий климата и оптимального состава ассоциации (новые для растения нематода, переносчик, гриб и бактерия) вредоносность нематод рода *Bursaphelenchus* как возбудителей болезней лиственных деревьев не меньше, чем у гельминтов хвойных, что видно на примере ГБИ и доказано в наших фитотестах.

Все разделы исследования опубликованы в изданиях списка ВАК, WOS, SCOPUS.

Выводы

1. Группы нематоды, ассоциированные с переносчиком, обладают наибольшим разнообразием жизненных циклов. Фауну ксилобионтных нематод лиственных деревьев следует разделить на экогруппы, из которых потенциальными агентами трансмиссивных эпифитотий служат группы фитопаразитов и комменсалов с высокими темпами размножения, ассоциированные с переносчиками и обладающие особым трансмиссивным поколением.

2. У представителей рода *Bursaphelenchus* личинки особого трансмиссивного поколения, относящиеся к разным филогенетическим группам, отличаются стадией развития, это обусловлено специфичностью нематод к разным семействам переносчиков.

3. Впервые выявлены отличия видов разных экогрупп в стадиях выживания, плодовитости и времени генерации, как критериев специализации в системе паразит-хозяин и паразит-переносчик. В результате применения пошагового подхода исследования динамики популяции и онтогенеза найдены важные отличия следующих параметров, обусловленные типом трофики (бактериотроф или фито-микопаразит) и специализацией к паразитизму: время одной генерации; сроки линек; суточная плодовитость самок; стадии диапаузы и дисперсии пропативного поколения; наличие энтомохорной трансмиссивной личинки и её отличие от пропативной дисперсионной стадии; продолжительность жизни самок, продолжительность популяционного цикла в условиях первоначального изобилия пищи; способность к формированию группы дисперсии.

4. Динамика популяции нематод *in vitro* характеризуется первоначальным экспоненциальным ростом, что можно выразить математическими моделями и использовать для оценки сроков заселения 1 м³ древесины модельными видами нематод и их симбионтами (бактериями и грибами).

5. Впервые экспериментально доказано, что виды рода *Bursaphelenchus* могут иметь собственную специфичность к природному растению-хозяину, которая не обусловлена предпочтениями переносчика.

6. Стволовые нематоды – паразиты лиственных столь же вредоносны, как гельминты хвойных. Их патогенность оппортунистическая, что обусловлено лабильной синергией ассоциации трех патогенов: нематоды, гриба и жука-переносчика.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

ПУБЛИКАЦИИ В ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК

1. Ryss A.Y., **Polyanina K.S.**, Popovichev, B.G., Subbotin, S.A. Description of *Bursaphelenchus ulmophilus* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae) associated with Dutch elm disease of *Ulmus glabra* Huds. in the Russian North West // *Nematology*. – 2015. 17: 685–703 p. DOI: 10.1163/15685411-00002902.
2. Ryss A.Y., **Polyanina K.S.** Diagnostics of the stages of post-embryonic development in *Bursaphelenchus ulmophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) // *Паразитология*. – 2017. 51: 466–480.
3. Ryss A.Y., **Polyanina K.S.** Characterization of Juvenile Stages of *Bursaphelenchus crenati* Rühm, 1956 (Nematoda: Aphelenchoidoidea) // *Journal of Nematology*. – 2018. 50: 459–472 p. DOI: 10.21307/jofnem-2018-042.
4. Ryss A.Y., **Polyanina K.S.**, Petrov A.V., Sazonov A.A., Mandelshtam M.Y., Subbotin S.A. Reports of *Bursaphelenchus crenati* (Nematoda: Parasitaphelenchinae) from Belarus and Russia with a key and phylogeny of the *Sexdentati* group // *Forest Pathology*. – 2018a. 48: 1–38 p. DOI: 10.1111/efp.12534.
5. Ryss A.Y., **Polyanina K.S.**, Popovichev B.G., Krivets S.A., Kerchev I.A. Plant host range specificity of *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya et Enda, 1979 tested in the laboratory experiments // *Паразитология*. – 2018b. 52: 32–40.
6. **Polyanina K.S.**, Mandelshtam M.Y., Ryss A.Y. Brief Review of the Associations of Xylobiont Nematodes with Bark Beetles (Coleoptera, Curculionidae: Scolytinae) // *Entomol. Rev.* – 2019. 99: 598–614 p. DOI: 10.1134/S0013873819050038.
7. **Polyanina K.S.**, Ryss A.Y. Parameters of ontogeny and population dynamics modeling of *Panagrolaimus detritophagus* (Nematoda: Rhabditida) *in vitro* // *Proceedings of the Zoological Institute RAS*. – 2021. 325(1): 91–98. DOI: 10.31610/trudyzin/2021.325.1.91.
8. Ryss A.Y., **Polyanina K.S.**, Álvarez-Ortega S., Subbotin S.A. Morphology, development stages and phylogeny of the *Rhabditolaimus ulmi* (Nematoda: Diplogastridae), a phoront of the bark beetle *Scolytus multistriatus* from the elm *Ulmus glabra* Huds. in Northwest Russia // *Journal of Nematology*. – 2021. 53: 1–41 p. DOI: 10.21307/jofnem-2021-025.
9. Ryss, A., **Polyanina, K. S.** Life cycle and population dynamics of *Bursaphelenchus willibaldi* (Nematoda: Rhabditida: Aphelenchoididae) *in vitro* // *Nematology*. – 2022a. – T. 24. – № 10. – С. 1105-1119. DOI: 10.1163/15685411-bja10194
10. Ryss A. Y., **Polyanina K. S.** Life cycle and population dynamics of the *Rhabditolaimus ulmi* (Nematoda: Rhabditida: Diplogastridae) *in vitro* // *Russian Journal of Nematology*. – 2022b. 30: 21–30 p. DOI: 10.24412/0869-6918-2022-1-21-30. DOI: 10.24412/0869-6918-2022-1-21-30

11. Ryss, A. Y., Polyamina, K. S. The development and population dynamics of *Aphelenchoides* sp. from *Quercus robur* (Nematoda: Rhabditida: Aphelenchoididae) in vitro // Russian Journal of Nematology. – 2022c. – Т. 31. – № 1. – С. 1-15.
12. Ryss, A., Polyamina, K. S. The pharyngeal and genitalia-associated muscles of *Rhabditolaimus ulmi* (Nematoda: Chromodorea: Rhabditida: Diplogastridae) // Nematology. – 2022d. – С. 1-16. DOI: 10.1163/15685411-bja10216

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА КОНФЕРЕНЦИЯХ

1. Ryss A.Y., Polyamina K.S., Popovichev B.G. Mycotrophic plant parasitic nematodes as a threat to the forests and parks of the Russian Federation // Pests and Diseases of Woody Plants in Russia / Proceedings of the International Conference. Saint Petersburg (Russia), November 18–20, 2014 / D. L. Musolin and A. V. Selikhovkin (eds.). Saint-Petersburg State Forest Technical University. DOI: 10.13140/2.1.4585.6324.
2. Ryss A.Y., Polyamina K.S. Nematode impact in the Dutch elm disease in NW Russia: entomophilic dauers in *Scolytus* spp. and their adult stages in wood // Eleventh International Symposium of the Russian Society of Nematologists, 6–11 July, 2015a. Cheboksary, Russia. Russian Journal of Nematology. 23 (2): 66–67.
3. Ryss A.Y., Polyamina K.S. Xylobiont nematodes parasitizing elm *Ulmus glabra* in parks of St. Petersburg, Russia // Eleventh International Symposium of the Russian Society of Nematologists, 6–11 July, 2015b. Cheboksary, Russia. Russian Journal of Nematology. 23 (2): 168.
4. Polyamina K.S., Popovichev B.G., Ryss A.Y. Elm wood nematodes as a threat to the urban woody plantations in the Russian North-West: the laboratory tests of woody plant host range and pathogenicity // Dendrobiotic Invertebrates and Fungi and their Role in Forest Ecosystems./Proceedings of the International Conference. Saint Petersburg, Russia Saint Petersburg State Forest Technical University. 2016. 90–91.
5. Ryss A.Y., Polyamina K.S. Saproxylic nematodes of elm and their associations with insect vectors // Twelfth International Symposium of the Russian Society of Nematologists “Nematodes and other Ecdysozoa under the growing ecological footprint on ecosystems”. Nizhny Novgorod, Russian Federation. 2017. 91–92.
6. Ryss A.Y., Polyamina K.S., Skryabina M.D. Wood nematodes with polyxenic life cycles are the possible wilt causative agents of two deciduous woody plant species // Contemporary parasitology — major trends and challenges Proceedings of the VI Congress of the Society of Parasitologists, Russia: International Conference, October 15–19, 2018, Saint Petersburg. 211.
7. Полянина К.С., Субботин С.А., Сазонов А.А., Звягинцев А.В. Петров В.Б., Мандельштам М.Ю., Рысс А.Ю. Нематофауна вилта ясеня *Fraxinus excelsior* L. и обнаружение ясеневое бурсафеленха *Bursaphelenchus crenati* Rühm (Nematoda: Aphelenchoididae) в России и Беларуси // X Чтения памяти О. А. Катаева: Санкт-Петербург, 2018. Санкт-Петербург. 84 с. DOI: 10.21266/SPBFTU.2018.КАТАЕВ.1
8. Рысс А.Ю., Полянина К.С., Скрябина М.Д. Стволовые нематоды лиственных деревьев: цикл развития и специфичность к растениям-хозяевам // Доклады Международной научной конференции, посвященной 140-летию со дня рождения академика К.И. Скрябина. Москва. – 2018. С/ 216.
9. Полянина К.С., Рысс А.Ю. Трансмиссивные нематодозы древесных растений // Отчётная научная сессия ЗИИ РАН по итогам работ 2018 г. Санкт-Петербург. 31–33.
10. Polyamina K.S., Ryss A.Y. Life cycles of xylobiont nematodes with special reference to three species parasitizing deciduous trees // Nematodes and other Ecdysozoa under changing environments. Abstracts of 13th International Nematological Symposium, 2019. Petrozavodsk, Russia. 63–65.
11. Polyamina K.S., Ryss A.Y. *Rhabditolaimus ulmi* (Nematoda: Diplogastridae) – a symbiotic phoront of the bark beetle *Scolytus multistriatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) from the elm *Ulmus glabra* in north-western Russia // Dendrobiotic Invertebrates and Fungi and their Role in Forest Ecosystems. Proceedings of the All-Russian conference with int. participation. Saint Petersburg (Russia), November, 24–27, 2020. С.259–260.
12. Полянина К.С., Рысс А.Ю. Нематоды, ассоциированные с голландской болезнью ильмовых *Ulmus* spp. и ее переносчиками *Scolytus* spp.: жизненные циклы и модели динамики популяции // Отчётная научная сессия ЗИИ РАН по итогам работ 2020 – 2021 г. Санкт-Петербург.
13. Ryss A.Y., Polyamina K.S. A model of the ontogenesis and population dynamics of saproxylic nematodes (on *Panagrolaimus detritophagus*) // Russian Journal of Nematology. – 2021. (29) 2: 195.
14. Рысс А.Ю., Полянина К.С. Параметры онтогенеза и популяционных циклов у четырех модельных видов сапроксильных нематод лесных и парковых экосистем // Материалы XIX Всероссийского совещания по почвенной зоологии: Биота, генезис и продуктивность почв. 15–19 августа 2022 г., Улан-Удэ. С.140–141.
15. Полянина К.С., Рысс А.Ю. Изучение онтогенеза и популяционных циклов ксилобионтных нематод // VIII Всероссийская конференция с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии». 12–16 сентября 2022. Севастополь, ФИЦ ИнБЮМ.