

УДК 630.4 : 632:6

© 2015 К. В. Давиденко<sup>1</sup>, Ю. Є. Скрильник<sup>2</sup>, В. Л. Мєшкова<sup>2</sup>

1. Харківська державна зооветеринарна академія  
2. УкрНДІ лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г. М. Висоцького

## СТОВБУРОВІ НЕМАТОДИ У ВСИХАЮЧИХ НАСАДЖЕННЯХ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ ВОЛИНСЬКОГО ПОЛІССЯ

*Давиденко К. В., Скрильник Ю. Є., Мєшкова В. Л. Стовбурові нематоди у всихаючих насадженнях сосни звичайної Волинського Полісся. Вивчали поширення нематод роду Bursaphelenchus в усихаючих насадженнях сосни звичайної у Волинській області. Загалом 80 зразків деревини відібрано на різній висоті з 20 дерев, які характеризувалися різною категорією санітарного стану. Види роду Bursaphelenchus були виявлені лише в усихаючих деревах (IV категорії санітарного стану). П'ять видів Bursaphelenchus species були ідентифіковані: Bursaphelenchus mucronatus, Bursaphelenchus pinophilus і три види – Bursaphelenchus sp. В усіх зразках переважала B. mucronatus. Нематод не виділено з дерев III категорії санітарного стану, ослаблених дереворуйнівними грибами (ДРГ), а також із дерев, не заселених короїдами.....21 назв.*  
**Ключові слова:** стовбурові нематоди, сосна звичайна, короїди.

*Давиденко Е. В. Скрыльник Ю. Е., Мешкова В. Л. Стволовые нематоды в усыхающих насаждениях сосны обыкновенной Волинского Полесья. Изучали распространенность нематод рода Bursaphelenchus в усыхающих насаждениях сосны обыкновенной в Волинской области. Всего 80 образцов древесины отобрано на разной высоте с 20 деревьев, характеризующихся разной категорией санитарного состояния. Виды рода Bursaphelenchus были обнаружены только в усыхающих деревьях (IV категории санитарного состояния). Пять видов Bursaphelenchus species были идентифицированы: Bursaphelenchus mucronatus, Bursaphelenchus pinophilus и три вида – до рода. Во всех образцах доминировала B. mucronatus. Нематоды не выделены из деревьев III категории санитарного состояния, ослабленных древоразрушающими грибами (ДРГ), а также из деревьев, не заселенных короедами. ....21 назв.*  
**Ключевые слова:** стволовые нематоды, сосна обыкновенная, короеды.

*Davydenko K. V., Skrylnyk Yu. Ye., Meshkova V. L.. Stem nematodes in declining stands of Scots pine in Volyn' Polissya. The incidence of Bursaphelenchus species in declining Pinus sylvestris stands in the Volyn' region was studied. A total of 80 samples from 20 trees showing different degree of decline were taken on different height. Bursaphelenchus species were only found in dying trees (IV category of sanitary condition). Five Bursaphelenchus species were identified: Bursaphelenchus mucronatus, Bursaphelenchus pinophilus and three Bursaphelenchus spp. B. mucronatus was the most frequent species. It was isolated from 100 % Bursaphelenchus-positive samples. Bursaphelenchus species and other nematodes were not found in the trees of the third category of sanitary condition, weakened by wood decaying fungi, as well as from the trees, which were not colonized by bark beetles. The quarantine species, Bursaphelenchus xylophilus, was not detected.....21 ref.*  
**Key words:** stem nematodes, Scots pine, bark beetles.

**Вступ.** Останнім часом у Волинському Поліссі відмічається стійка тенденція збільшення площі всихаючих соснових насаджень і суттєве зростання обсягів суцільних і вибіркових санітарних рубок. Подібні процеси відбуваються не тільки в різних регіонах України [3–5], але й у інших країнах Європи, де комплекс стовбурових шкідників, фітопатогенних грибів і нематод спричиняє всихання суцільних лісових масивів [18]. Серед цього комплексу помітне місце посідають адвентивні шкідливі організми, поширенню яких сприяють зміна клімату та глобалізація міжнародної торгівлі [8, 10, 20].

Нематоди, які паразитують на деревах, є найменш вивченою групою шкідливих організмів. Стовбурові нематоди (Nematoda; Aphelenchoididae) привернули до себе особливу увагу європейських науковців у 1999 році після виявлення *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1970 у Португалії на всихаючих деревах сосни приморської (*Pinus pinaster* Ailton). Ця нематода з деревиною потрапила з Азії в Європу, а туди, можливо, — з Північної Америки [8, 15]. Переносниками стовбурних нематод переважно є жуки роду *Monochamus* (Cerambycidae). Так, у Португалії 54 % жуків вусача *Monochamus galloprovincialis* (Olivier, 1795), зібраних в осередку всихання сосни, містили личинок стовбурових нематод чисельністю до 72000 екз. в одній особині [13]. Проникнення личинок нематод у деревину полегшується під час живлення жуків вусача на молодих пагонах і відкладання яєць, причому лише 25 % нематод потрапляють у деревину [6, 13]. Наявність переносників нематод і сприятливих кліматичних умов для розвитку цих шкідників у Західній Європі сприяли швидкому їхньому поширенню [10].

Стовбурові нематоди роду *Bursaphelenchus* живляться паренхімними клітинами смоляних каналів сосни, що може спричинити в'янення та всихання дерев [2]. Так, хвороба в'янення сосни, яку спричиняє соснова стовбурава нематода *Bursaphelenchus xylophilus*, завдає значних збитків сосновим лісам в Азії. В Північній Америці завдає значних збитків інтродукованим видам сосни у, в той час як більшість місцевих видів види виявляють резистентність до ураження [7].

Патогенність *B. xylophilus* для дерев хвойних порід є загальновизнаною, тоді як патогенної дії *B. mucronatus* Mamiya and Enda, 1979 не доведено [2, 13]. Дослідження О. С. Єрошенка [1] на сході Росії свідчать, що окремі форми *B. mucronatus* є патогенними для ялини. Виявлено високу вірулентність далекосхідного ізоляту цієї нематоди для *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. і *Larix olgen* A. Henry [6].

Серед майже 50 відомих видів стовбурових нематод [19] на території Полісся ідентифіковано лише один вид — *B. mucronatus* [3]. У Карпатах цю нематоду ізолювано із сухих, всихаючих і без ознак усихання дерев ялини, що дало можливість припустити її участь у процесі всихання насаджень [2, 3]. Водночас згідно з основними постулатами Коха [17], щоб довести патогенність виду і зробити висновок про його спроможність уражувати дерева, необхідно виділити патоген з хворої рослини, визначити вид, заразити здорову рослину культурою патогена та реізолювати патоген із ураженої рослини.

Донині не виявлені особливості поширення стовбурових нематод у соснових насадженнях Полісся та можливі їхні переносники. Це стало підставою для початку комплексних досліджень, першим кроком яких було освоєння доступної та адекватної методики виділення нематод у чисту культуру та їхнього утримання.

У зв'язку з цим, метою наших досліджень було уточнення методичних аспектів виділення й визначення видового спектра стовбурових нематод і виявлення особливостей поширення їх у деревах сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.)

**Матеріали і методи.** Польові дослідження проведені у насадженнях сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) віком 48–86 років у Вівчецькому (кв. 43–45) та Оконському ДП (кв. 15) лісництвах ДП «Маневицьке ЛГ» Волинського обласного управління лісового та мисливського господарства.

У кожному осередку всихання було закладено тимчасові пробні площі (по 100 дерев). Було визначено санітарний стан кожного дерева [11], тип усихання та заселення стовбуровими шкідниками [9].

Зразки для аналізу на наявність нематод відбирали з модельних дерев II–IV категорій санітарного стану, які були зрубані біля пробних площ. З кожного дерева за допомогою пилки та свердла відбирали по 4 проби деревини (обов'язково з попереднім коруванням зразків) масою приблизно 180–250 г з висоти 2, 8, 10 і 16–20 метрів поблизу ходів короїдів. Загалом відібрано 80 зразків із 20 дерев. Частину зразків зберігали при

температурі -20°C для молекулярного аналізу на наявність патогенних грибів і нематод, а решту використовували для нематологічної експертизи за допомогою лійкового метода Бермана [7].

Для виділення нематод методом Бермана на лійку надягали гумову трубку відповідного діаметра завдовжки 5–7 см. У інший кінець трубки вставляли невелику пробірку, а в лійку поміщали капронову сітку з подрібненим до тирси зразком деревини у та заливали водою.

Для мікроскопічного аналізу через 24 години фіксували отриманих нематод у розчині ТАФ (триетонамін : формалін : вода — 2 : 7 : 9). Нематод визначали за допомогою мікроскопу ЛОМО Мікмед-1 у водно-гліцеринових препаратах з використанням визначника [20].

Для подальших досліджень виявлених після екстракції нематод вміщували по 100 особин в кожну чашку Петрі на культуру грибів *Botrytis cinerea* Pers. 1794 (спорову і безспорову) на 3 %-му солодовому агарі. Контейнери з пробами та культури зберігали в холодильнику при температурі до +5° С.

Молекулярну діагностику нематод проводили у лабораторії лісової патології Шведського Аграрного Університету. Реплікацію геномної ДНК нематод з отриманих культур здійснювали за допомогою полмеразної ланцюгової реакції (ПЛР) секвенуванням ITS регіону рибосомальної РНК (internal transcribed spacer rRNA) з використанням праймерів ITS1 [16] і ITS2 [21]. Поліморфний аналіз даних (ITS-RFLP) проводили з використанням п'яти рестрикційних ферментів (AluI, HaeIII, HinfI, MspI, RsaI) для створення конкретних видів профілю [14].

**Результати.** Із зразків деревини сосни за допомогою метода Бермана та молекулярного методу було виділено нематоди декількох видів (табл. 1).

### 1. Види нематод, виділені зі зразків деревини модельних дерев за допомогою метода Бермана та молекулярного методу

Модел- льне дерево	Категорія санітарного стану	Види нематод, визначені у зразках деревини за допомогою:			
		методу Бермана		молекулярного методу	
		кількість видів	визначені види*	кількість видів	визначені види*
5	III	1	<i>B. mucronatus</i>	2	<i>B. mucronatus</i>
8	III	1	<i>B. mucronatus</i>	2	<i>B. mucronatus</i>
9	IV	3	<i>B. mucronatus</i>	3	<i>B. mucronatus</i> , <i>B. fungivorus</i>
10	IV	3	<i>B. mucronatus</i>	6	<i>B. mucronatus</i> , <i>Bursaphelenchus</i> spp.1*
18	III	1	–	2	<i>B. mucronatus</i>
19	IV	3	<i>B. mucronatus</i>	11	<i>B. mucronatus</i> , <i>B. pinophilus</i> , <i>Bursaphelenchus</i> spp.1, 2, 3,*
20	IV	2	<i>B. mucronatus</i>	7	<i>B. mucronatus</i> <i>B. pinophilus</i> , <i>Bursaphelenchus</i> spp. 2*

Примітка. \* Видова належність деяких нематод ще не визначена, і роботи тривають. Деякі види роду *Bursaphelenchus* не дають 100-відсоткового збігу з базою даних генного банку NCBI (Fungal Databases of National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [12], тому вони були визначені як *Bursaphelenchus* spp.1, 2, 3.

Водночас видова належність деяких нематод ще не визначена, і роботи тривають. Серед визначених нематод не було виявлено патогенного виду *B. xylophilus*, занесеного до списку карантинних видів тварин майже в усіх країнах Європи. За допомогою

поліморфного молекулярного аналізу підтверджено наявність п'яти видів нематод роду *Bursaphelenchus*, із яких два визначені до виду (*B. mucronatus* і *B. pinophilus* Brzeski & Baujard, 1997), а три — до роду (*Bursaphelenchus* spp. 1, 2, 3).

Аналіз табл. 1 свідчить, що методом Бермана було визначено лише *B. mucronatus*, причому в усіх зразках наявність цього виду підтверджено молекулярним методом. Решту видів було визначено лише молекулярним методом. З тих самих зразків деревини молекулярним методом виявлено більшу кількість видів нематод, ніж методом Бермана. Водночас зважаючи на високу вартість проведення аналізів (вартість лише матеріалів для аналізу 1 зразка перевищує 120 €), використання молекулярних методів є виправданим лише у випадку визначення небезпечних карантинних шкідників, таких як *B. xylophilus*. Тому, незважаючи на втрати певної частини рухомих нематод під час виділення методом Бермана, цей метод є більш універсальним, ніж промивання або мікроскопування зразків.

Як видно з даних стосовно видового складу нематод, із кожного дерева III категорії санітарного стану (сильно ослаблених) виділено по одному виду нематод методом Бермана і по два — молекулярним методом. Водночас із дерев IV категорії (всихаючих) виділено в середньому по три види (округлено) нематод методом Бермана і по сім (округлено) — молекулярним методом. Таким чином, видовий склад нематод є багатшим за більшого ослаблення дерев.

Аналіз свідчить, що нематоди були відсутні в деревині дерев сосни II категорії санітарного стану (ослаблених), а також у зразках деревини, відібраних із дерев усіх проаналізованих категорій санітарного стану на висоті 2 і 8 м (табл. 2).

Щільність нематод на висоті 16–20 м була більшою, ніж на висоті 10 м, причому стосовно дерев III категорії санітарного стану різниця становила 1,3 разу, а стосовно дерев IV категорії санітарного стану — 19,6 разу (див. табл. 2). Одержані дані підтверджують приуроченість нематод до найбільш ослаблених дерев (усихаючих) і до верхніх частин стовбурів.

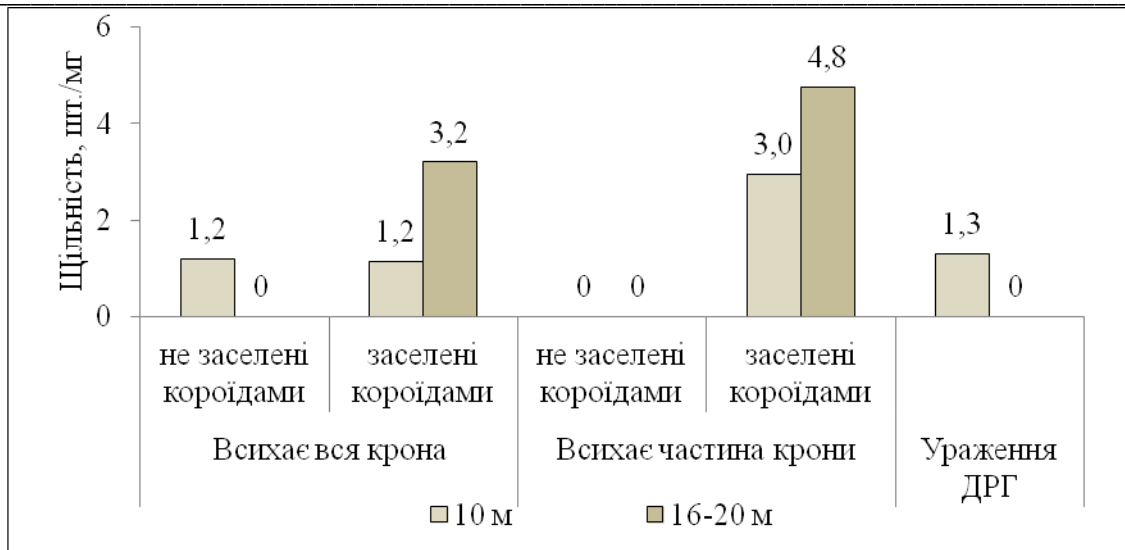
## 2. Середня щільність нематод (шт./мг деревини), виділених на різній висоті дерев II–IV категорій санітарного стану

Категорія санітарного стану дерев	Щільність нематод (шт./мг) на висоті, м			
	2	8	10	16–20
II	–	–	–	–
III	–	–	1,5	2,0
IV	–	–	31,5	618,8
Усі дерева	–	–	6,9	124,6

Крони дерев віком близько 50 років усихали суцільно — їхня крона мала рівномірне забарвлення від світло-зеленого дерев III категорії до жовто-буруватого дерев IV категорії санітарного стану. Водночас крони дерев віком понад 70 років усихали неодноразово. У межах крони окремі гілки залишалися яскраво-зеленими, а решта були яскраво-рудими, що виявлялося на деревах III і IV категорій санітарного стану. Усі модельні дерева IV категорії санітарного стану мали ознаки пошкодження стовбуру верхівковим короїдом, ураження офіостомовими грибами, що спричиняють синяву, та заселені нематодами.

Усі модельні дерева III категорії санітарного стану з наявністю ходів короїдів також були уражені офіостомовими грибами, які є додатковим субстратом для живлення стовбурових нематод [13], що сприяє їхньому швидкому розмноженню.

Із дерев III категорії санітарного стану, ослаблених дереворуйнівними грибами (ДРГ), нематод не було виділено (рис. 1).



**Рис. 1.** Щільність нематод (шт./мг) у зразках деревини дерев сосни III категорії санітарного стану, відібраних на висоті 10 і 16–20 м.

У зразках деревини, відібраних на висоті 10 м із дерев III категорії санітарного стану, що всихали рівномірно, щільність нематод була однаковою за наявності чи відсутності ходів короїдів. Водночас на висоті 16–20 м нематод виявляли лише біля ходів короїдів. Наявність нематод у зразках деревини, відібраних на висоті 10 м за відсутності поблизу короїдних ходів можливо пояснити тим, що вони потрапили туди з кори.

У зразках деревини дерев III категорії санітарного стану із частковим усиханням крони, не заселених короїдами, нематод не було виявлено, тоді як на дерев із частковим усиханням крони, заселених короїдами, щільність нематод була найвищою на обох рівнях висоти (див. рис. 1).

**Висновки.** Методом Бергмана та молекулярними методами підтверджено наявність п'яти видів нематод роду *Bursaphelenchus*, із яких два визначені до виду (*B. micronatus* і *B. pinophilus*), а три — до роду. Серед визначених нематод не виявлено патогенного виду *B. xylophilus*, занесеного до списку карантинних видів тварин майже в усіх країнах Європи. В усіх зразках переважала *B. micronatus*.

З тих самих зразків деревини молекулярним методом виявлено більшу кількість видів нематод, ніж методом Бермана. Зважаючи на високу вартість проведення аналізів, використання молекулярних методів є виправданим лише у випадку визначення небезпечних карантинних шкідників. Нематоди роду *Bursaphelenchus* виявлені у зразках деревини сильно ослаблених, всихаючих і всохлих дерев сосни звичайної на висоті не меншій 10 м. Нематод не виділено із дерев III категорії санітарного стану, ослаблених дереворуйнівними грибами (ДРГ), а також із дерев, не заселених короїдами.

**Бібліографічний список:** 1. **Ерошенко А. С.** Некоторые итоги изучения нематод лесов Дальнего Востока России / **А. С. Ерошенко** // Основные достижения и перспективы развития паразитологии. Матер. междунар. конф., посв. 125-летию К. И. Скрябина к 60-летию основания лаб. гельминтологии АН СССР И-та паразитологии РАН (14–16 апреля 2004 г., г. Москва). — Москва. — С. 102–103. 2. **Козловський М. П.** Збереження біорізноманіття ґрунтових нематод у похідних екосистемах і шляхи формування в них нефітопатогенних комплексів / **М. П. Козловський** // Наук. записки Державного природознавчого музею. — 2007. — Том 23. — С. 55–64. 3. **Козловський М. П.** Стовбурові нематоди як чинник зниження стійкості та всихання смереки / **М. П. Козловський** // Лісове госп., лісова, паперова і деревообробна пром-сть. — Вип. 30. — Львів: НЛТУ України, 2006. —

С. 321–326. **4. Комплексна оцінка** поширення лісопатологічних процесів (диференційовано адміністративним областям України) та прогноз поширення патологічних процесів у лісах України до 2015 року / укл. І. М. Усцький. — Х., 2010. — 53 с. **5. Крамарець В. О.** Популяційно-генетична мінливість ялини європейської (*Picea abies* (L.) Н. Karst.) в Українських Карпатах за результатами аналізу ядерної ДНК / В. О. Крамарець, Р. Т. Гут, А. Дзялук // Наук. праці Лісівничої академії наук України. — 2013. — Вип. 11. — С. 97–101. **6. Кулинич О. А.** Древесные нематоды рода *Bursaphelenchus* на территории России: методы выделения и диагностики / О. А. Кулинич, А. Ю. Рысс // Прикладная нематология. — 2006. — С. 162–186. **7. Кулинич О. А.** Инструкция по выявлению и диагностике сосновой стволовой нематоды *Bursaphelenchus xylophilus* и мерам по предотвращению ее заноса, локализации и ликвидации очагов / О. А. Кулинич, В. Л. Пономарев, А. Ю. Рысс, В. Н. Чижов. — ФГУ «ВНИИКР», 2007. — 24 с. **8. Кулинич О. А.** Использование ПЦР-диагностики для идентификации карантинных видов нематод / О. А. Кулинич, А. Ю. Рысс, А. Ю. Чернецкая, В. Л. Пономарев, Д. Ю. Рязанцев, С. К. Завриев // Защита и карантин растений. — 2008. — № 9. — С. 36–38. **9. Методичні рекомендації** щодо обстеження осередків стовбурових шкідників лісу / відпов. укл. В. Л. Мешкова. — Х.: УкрНДЛГА, 2011. — 27 с. **10. МСФМ № 5.** Международные стандарты по фитосанитарным мерам. Глоссарий фитосанитарных терминов. — Рим, ФАО. 2007. — 40 с. **11. Санітарні правила** в лісах України. — К.: Мінлісгосп України, 1995. — 11 с. **12. Altschul S. F.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman // Nucleic Acids Res. — 1997. — Vol. 25. — Pp. 3389–3402. **13. Braasch H.** *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: distribution and morphological relationships / H. Braasch. // EPPO Bulletin. — 2001. — Vol. 31. — Pp. 127–142. **14. Burgermeister W.** ITS-RFLP analysis, an efficient tool for differentiation of *Bursaphelenchus* species / W. Burgermeister, H. Braasch, K. Metge, J. Gu, T. Schröder, E. Woldt // Nematology. — 2009. — Vol. 11. — Pp. 649–668. **15. EPPO** Diagnostic protocols for regulated pests: *Bursaphelenchus xylophilus*. — EPPO standard. — 2000. — PM 7/4 (1). EPPO website: [www.eppo.org](http://www.eppo.org). **16. Kanzaki N.** A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the xylophilus group / N. Kanzaki, K. Futai // Nematology. — 2002. — Vol. 4 (1). — P. 35–42. **17. Koch R.** Über die Milzbrandimpfung. Eine Entgegnung auf den von Pasteur in Genf gehaltenen Vortrag // R. Koch. — Leipzig 1882, Verlag von Georg Thieme // Gesammelte Werke von Robert Koch (Band 1) / J. Schwalbe. — S. 207–231. **18. Kulinich O. A.** Distribution of conifer beetles (*Scolytidae*, *Curculionidae*, *Cerambycidae*) and wood nematodes (*Bursaphelenchus* spp.) in European and Asian Russia / O. A. Kulinich, P. D. Orlinskii // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 1998. — Vol. 28, No. 1–2. — Pp. 39–52. **19. Mamiya Y.** Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) / Y. Mamiya, N. Enda // Nematologica. — 1972. — Vol. 18. — Pp. 159–162. **20. Ryss A.** A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species / A. Ryss, P. Vieira, M. Mota, O. Kulinich // Nematology. — 2005. — Vol. 7 (3). — Pp. 393–458. **21. White T. J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White, T. Bruns, S. Lee, J. W. Taylor // M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (eds.). PCR protocols: a guide to methods and applications. — Academic Press, San Diego, USA. 1990. — Pp. 315–322.

E-mail: [kateryna.davydenko74@gmail.com](mailto:kateryna.davydenko74@gmail.com);

[sklif83@mail.ru](mailto:sklif83@mail.ru); [valentynameshkova@gmail.com](mailto:valentynameshkova@gmail.com)

Одержано редколегією 10.12.2015 р.