

А.Ю. Рысс

САМЫЕ ПРОСТЫЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ СТВОЛОВЫХ НЕМАТОД И ИХ ЛАБОРАТОРНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Наблюдаемые в 2010–2015 гг. выпадения массивов леса приурочены в основном к пяти регионам Российской Федерации, в которых средняя температура 30 самых жарких дней 2010 г. превысила на 7 °С среднюю климатическую норму. Это – Московский регион (Москва и окружающие области, где температура июля доходила до 41 °С), Поволжье, Черноземье (Воронежская и Белгородская обл.), Бурятия с Алтайским краем и Республикой Алтай, а также Приморский край [Аномальная жара ..., 2015]. После экстремальных температур 2010 г. распространение получили вилты древесных пород, связанные с ассоциациями патогенов: нематод р. *Bursaphelenchus* и грибов сем. Ophiostomataceae, а также жуков сем. Curculionidae и Cerambycidae, переносящих дауер личинок нематод и споры грибов. Дауеры – это специализированные личинки энтомофильного поколения стволовых нематод с упрощенной анатомией и редуцированной пищеварительной системой; их функция – расселение нематод с больного на здоровое растение, с использованием насекомого-переносчика.

Для контроля распространения вилта необходимо выявить все патогенные организмы, составляющие ассоциацию возбудителей вилта конкретного вида древесного растения. Цель настоящего сообщения – пояснить, как самыми простыми методами и с помощью учебного микроскопа с малым увеличением можно обнаружить нематодную инфекцию.

Обнаружение нематод в жуках-переносчиках. Поскольку нематод возбудителей вилта переносят жуки, то можно провести отлов жуков усачей и короедов в период их интенсивного вылета (апрель–июнь). Для этого ставят ловушки или собирают недавно сформировавшихся из куколок имаго в бревнах, в местах лесозаготовок и на пилорамах. Усачей собирают на стадиях имаго и куколок, а короедов – также на стадии личинок. Короеды – исторически наиболее древние переносчики нематод р. *Bursaphelenchus*. Личинки этих жуков обладают тонкими покровами, через которые могут проникнуть расселительные личинки нематод – дауеры. Предпочтительно

собирать имаго самок, в них выше вероятность обнаружить дауеры нематод. Вскрывают жуков скальпелем в физиологическом растворе (0,9 % поваренной соли) в чашке Петри диаметром 3 см (лучше использовать пластиковую чашку, чтобы не затупить лезвие). Для приготовления раствора достаточно добавить две чайные ложки соли в 1,5-литровую бутылку воды. Нематоды локализованы у основания надкрыльев жука, в жировых клетках, внутри трахей и в гемоцеле. Они медленно высвобождаются из тканей насекомого. Суспензию просматривают под малым увеличением микроскопа, проверяя на наличие дауер личинок. Через 5 ч при комнатной температуре суспензия может начать загнивать, поэтому дважды – через 30 мин и 5 ч – суспензию из насекомых, содержащих дауеры, сливают в пробирку, фиксируют 4 %-м формалином; в чашку Петри каждый раз вливают новую порцию физиологического раствора, и вскрытое насекомое оставляют в холодильнике при 8 °С, где нематоды продолжают выходить еще 5–7 дней. Ежедневно раствор заменяют, а слитую суспензию также фиксируют формалином или сливают в культуру гриба *Botrytis cinerea* Pers., 1794 (серая гниль, методику приготовления см. ниже), в которой дауер личинки линяют на половозрелых червей и размножаются, продуцируя пропативные поколения, предназначенные для быстрого размножения (от англ. термина propagation – размножение) в тканях растения или мицелии гриба. Через неделю, когда культура размножится, половозрелых нематод фиксируют в ТАФ (7 мл 37 %-го формальдегида, 2 мл триэтаноламина, 91 мл дистиллированной воды) или 4 %-м формалине. Изготавливают постоянные препараты половозрелых самцов и самок нематод. Идентифицируют вид нематод только по половозрелым особям нематод пропативного поколения.

Дауер личинок можно выделять также методом Берманна на фильтре (см. ниже), однако в этом случае экстракция длится 6–12 ч (до загнивания суспензии), а за это время дауеры успевают перелинять на личинок следующей стадии, что затрудняет правильное определение номера стадии дауер личинок (3-й или 4-й, что важно при определении группы видов бурсафеленхов) и снижает их способность к размножению в лабораторной культуре гриба.

Симптоматика нахождения стволовых нематод в деревьях и процедура сбора. При сборе стволовых нематод в древесине необходимо учитывать динамику развития вилта: при заражении растения при вторичном питании только что вылетевшей из куколочной камеры больной молодой самки жука, дауеры нематод попадают в место питания перенос-

чика, т. е. в ранку на верхушке дерева, где происходит развитие колонии нематод пропативного поколения, формирующегося из внесенных жуком дауров-основателей. Лишь впоследствии нематоды опускаются вниз по проводящим сосудам растения-хозяина. Поэтому надо исследовать в первую очередь вершины (от второй до четвертой мутовки) ветровальных и спиленных деревьев с симптомами начального увядания, обращая внимания на следы погрызов насекомых, а также на лётные отверстия. Такие участки (пятна) необходимо выпиливать или выстругивать топором, выбирая наружный 1-см слой заболони с галереями и следами погрызов жуков. Собранную щепу (объемом 200–400 см³) нужно поместить в полиэтиленовый мешок или завернуть в бытовую тонкую полиэтиленовую пленку и снабдить этикеткой с информацией о виде дерева, месте и дате сбора. Нематоды сохраняются в такой пробе до 3 месяцев при комнатной температуре в помещении или до года в холодильнике при температуре 4...8 °С. Также нужно провести сбор тканей заболони с галереями жуков и наружными лётными отверстиями в нижней части ствола, учитывая, что это локализация зрелой стадия инфекции, где дауры – основатели колонии нематод внесены при яйцекладке самками жука-переносчика.

Выделение нематод из тканей растения хозяина. Нематод выделяют методом Берманна. Принцип этого метода состоит в том, что узкие черви тяжелее воды (их удельный вес примерно 1,15 г/см³) и подвижны; поэтому они постепенно опускаются в воде сквозь поры погруженного в воду фильтра, тогда как неподвижные частицы детрита и тканей древесины остаются сверху фильтра (рис. 1).

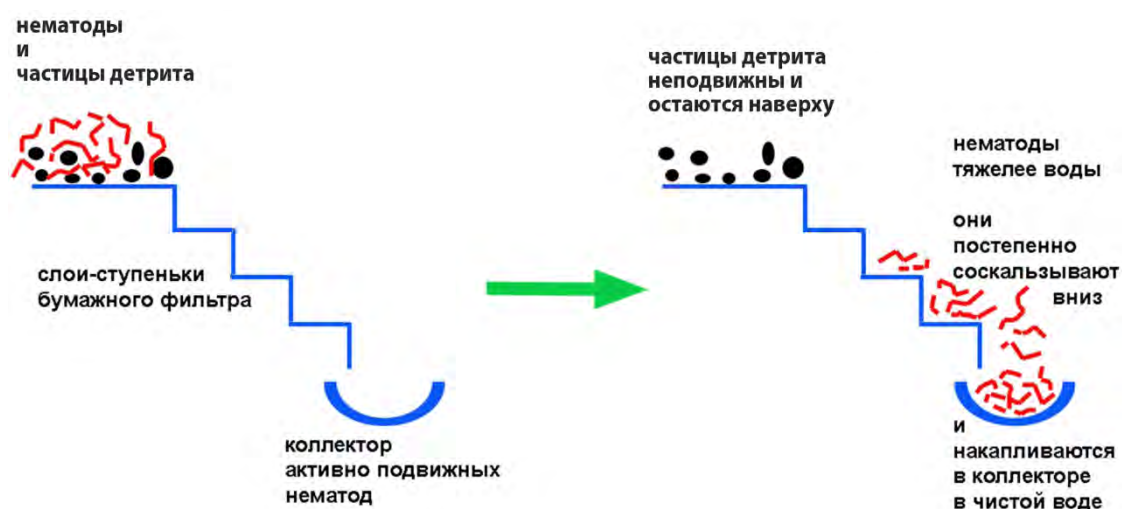


Рис 1. Принцип метода экстракции нематод по Берманну

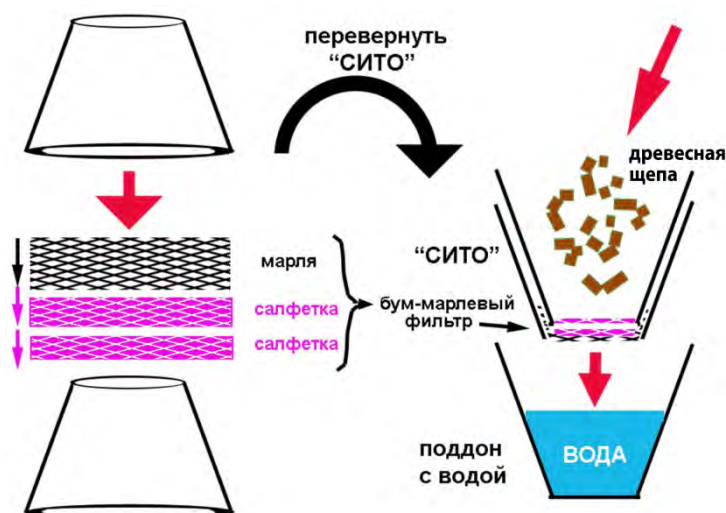


Рис. 2. Бумажно-марлевое сито и загрузка древесной щепы (образца)

Обычно метод Берманна применяют на воронках (Baermann funnel), однако в этом случае эффективность метода зависит от крутизны внутренней конической поверхности воронки и ее материала: на пологих пластмассовых воронках остается много нематод, не опустившихся вниз, и эффективность метода очень мала (менее 20 %). Поэтому чем ближе камера выделения к цилиндру, тем выше результативность выделения. В самом простом случае используют три одноразовых пластмассовых стакана объемом 200 мл, у двух из которых срезают дно. Один стакан ставят срезанным дном вверх, на него кладут двойной слой салфетки или двухслойную туалетную бумагу, а сверху – нестерильный бинт шириной 10 см. Накрывают вторым срезанным стаканом. Получается конструкция, похожая на сито (рис. 2).

«Сито» переворачивают дном вниз, и в него осторожно, чтобы не повредить фильтр, кладут измельченную секатором щепу собранного образца (примерно 50 г); в несрезанный стакан наливают воду и осторожно погружают сверху «сито» с щепой так, чтобы оно опустилось в нижний стакан с водой под действием собственного веса (рис. 2). Оставляют щепу на 12–48 ч. За это время из щепы выходит в воду и опускается на дно нижнего стакана достаточное количество нематод, и они остаются живыми, так как вода не успевает загнить. После экспозиции «сито» со щепой быстро и резко вынимают, а нижний стакан с водой и вышедшими нематодами ставят в наклонное положение (обычно экстракцию ведут в серии проб, поэтому серию стаканов ставят на поднос, наклон которого в 20–30° обеспечивает подложенная с одной из сторон подставка-упор высотой 3–4 см). Нематоды двигаются и поэтому медленно смещаются в нижний край наклоненного стакана. Через 30 мин воду в стакане осторожно изымают сверху шприцем с надетой вместо иглы тонкой трубкой-капилляром от перфузионных систем (аптечный «набор для капельницы»). Когда верхняя часть дна наклоненного стакана начинает

обнажаться сухим участком, оставшуюся жидкость сливают в 10-см трубочку с надетой на кончик трубки 1,5-мл пробиркой типа Эппендорф (рис. 3).

Жидкость отстаивают следующие 30 мин. За это время нематоды опускаются на дно пробирки. Пробирку снимают с конца трубки, позволяя верхней воде свободно вытечь из трубки мимо снимаемой пробирки. Пробирку ставят вертикально в держатель, из нее через 10 мин (время опускания нематод на дно) вынимают верхний слой воды до конической части пробирки (рис. 3.6). Затем содержимое конической части переливают в стекло с лункой, предварительно взболтав, и просматривают под микроскопом на 100–150-кратном увеличении (10-кратный объектив). Обычно благодаря строгому соблюдению цилиндрической, а не конической формы приспособлений для экстракции (сначала камеры экстракции, а затем трубки с надетой на нее пробиркой), в просмотровом стекле оказывается несколько сотен вышедших из древесины нематод (не менее 90 % вышедших из древесной щепы нематод). Материал просматривают как в живом, так и в фиксированном в 4 %-м формалине виде. Идентификацию материала ведут с помощью определителя или атласа фотографий [Society of Nematologists, 2015], выявляя нематод р. *Bursaphelenchus*. Самцы нематод видов этого рода имеют на кончике хвоста липкий пленчатый лепесток – бурсу, откуда и происходит название рода (рис. 4). Таким образом, надежно идентифицировать род можно только по половозрелым самцам.

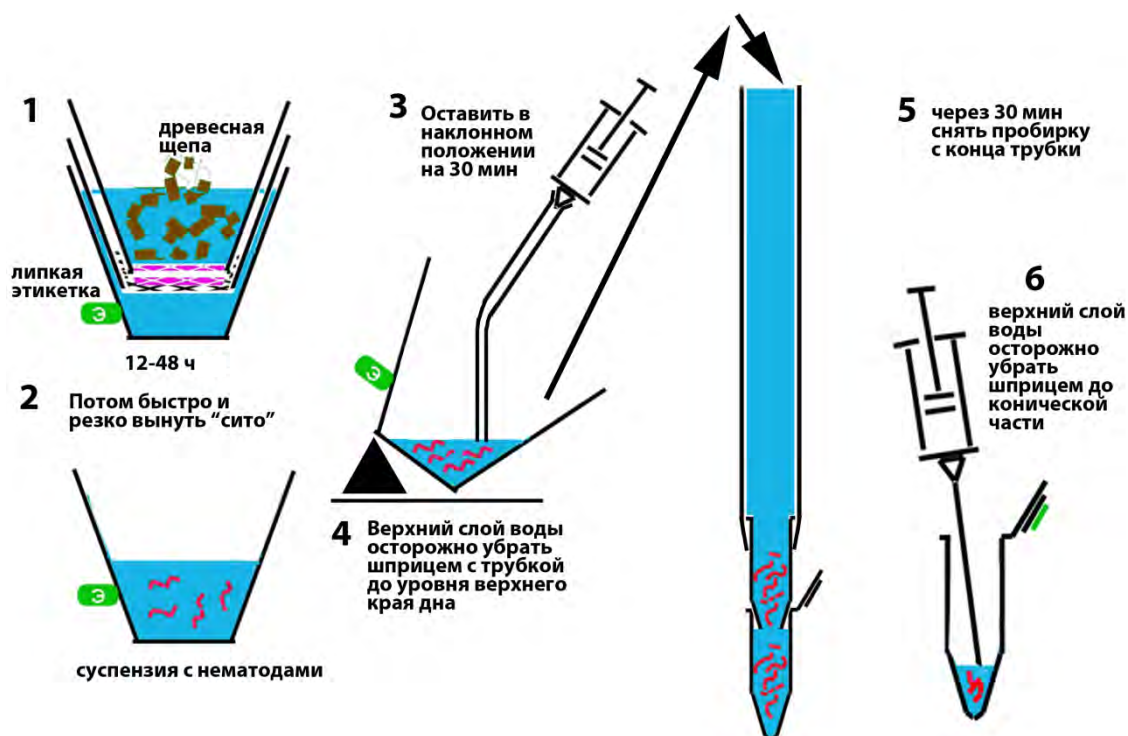


Рис. 3. Процедуры экстракции нематод: от камеры выделения до пробирки

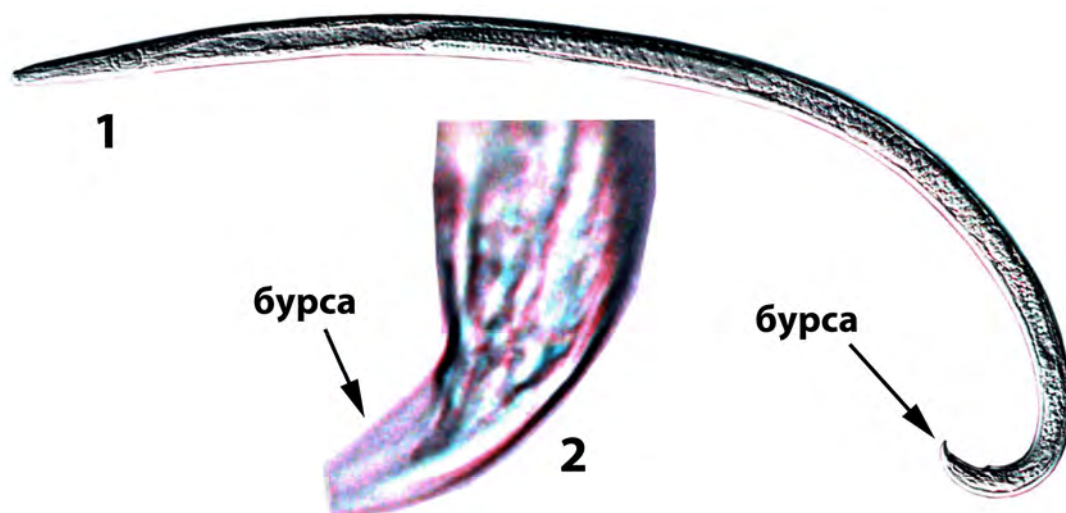


Рис. 4. Нематоды р. *Bursaphelenchus*: самец нематоды (1)
и хвостовой конец самца с бурсой (2)

Подготовка культур. Культуры микотрофных нематод размножают на грибе серой гнили *B. cinerea*. Для его получения нужно приготовить картофельный агар. Он продается в виде готового порошка или его можно приготовить из картофеля. Ниже указаны количества составляющих в расчете на 200 мл окончательной среды. В последнем случае 40–50 г очищенного от кожуры картофеля режут на мелкие куски и варят в 0,5 л воды в течение 1 ч, затем еще при кипении разминают толкушкой и пропускают через двойной слой марли на бытовом металлическом сите. Марлю не сильно отжимают в отфильтрованный раствор. Получается около 200 мл раствора, к которому добавляют 4 г агара и 4 г сахара (это один кусочек прессованного сахара), а также 10 мл аптечного глицерина. Переливают в термостойкий стакан или бутылку, сверху накрывают фольгой или неплотно надетой термостойкой пробкой, чтобы избежать испарения. Ставят в автоклав или пароварку под давлением и стерилизуют там 25 мин (после достижения максимального давления) при температуре 130 °С. Раствор сразу же разливают по стерильным чашкам Петри, или по микробиологическим пробиркам. Для получения скошенной поверхности агаровой среды, при использовании пробирок необходимо установить их в наклонном положении до застывания агара. После охлаждения до комнатной температуры стерилизованной над огнем спиртовки микробиологической петлей или скальпелем вносят маленький кусочек чистой культуры гриба *B. cinerea*. Лучше использовать мутантную лабораторную линию этого гриба без спор, но годится и любая линия серой гнили. Бесспорная линия более удобна для последующего наблюдения нематод, так как споры прилипают

к поверхности тела червя. Культуру не герметизируют, но оставляют на 5–7 дней при комнатной температуре для прорастания гриба, – газон гриба должен занять всю поверхность картофельного агара. Это происходит за 5–9 дней. После этого чашки герметизируют, опоясывая по окружности эластичной пленкой парафильм или лентой, катушки которой можно получить разрезанием рулона бытовой тонкой полиэтиленовой пленки на отрезки-катушки шириной 4–6 см. Герметизация – средство избежать высыхания культуры. Такие чашки можно хранить в холодильнике без пересева до 2 лет, просматривая ежемесячно и убирая чашки с пятнами (контаминация). При комнатной температуре чашки надо пересевать каждые 3 месяца, используя старую культуру как источник для серии новых культур серой гнили. Для размножения бурсафеленхов лучше использовать свежие культуры гриба возрастом не более 1 месяца.

Заражение культур гриба серой гнили *B. cinerea* ствольными нематодами, выделенными из древесины. Для размножения нематод, выделенных из древесины, используют два метода.

Первый метод (заражения неселектированной суспензией) используют, если есть уверенность, что образец содержит ствольных нематод, которых идентифицировали по наличию характерных самцов. В этом случае можно просто слить 0,5 мл полученной суспензии живых нематод в культуру гриба. Микотрофные нематоды размножатся за 1–3 недели в культуре гриба при комнатной температуре (20...22 °C). Ряд исследователей отмечает, что размножение нематод быстрее идет в темноте, но опыт автора этого не подтверждает. Факт размножения легко наблюдать: нематоды съедят весь гриб, обнажится поверхность агара. Сами нематоды в массе перепоползут на верхнюю крышку чашки Петри или на верхнюю часть пробирки культуры. Этот метод хорош тем, что он нетрудоемкий и быстрый, но есть опасность заражения культуры другими размножающимися грибами зеленого цвета, они ядовиты и могут убить нематод примерно в 30 % случаев.

В остальных случаях, кроме успешного размножения нематод, происходит также и селекция внутри источника культуры: размножаются лишь некоторые микотрофы, обычно виды р. *Bursaphelenchus* и *Aphelenchoides*, а при повторных пересевах, как правило, выживает наиболее конкурентоспособный вид – это быстро размножающийся *Buraphelenchus*.

Второй метод используют только в очень обильных микотрофными фитонематодами пробах. В них можно сразу после экстракции получить чистую культуру бурсафеленхов. Для этого нужно выбрать иглой под биноклем инокулюм в виде 20–25 особей, половозрелых самцов и самок, и

каплю дистиллированной воды с нематодами слить в центр чашки Петри с культурой серой гнили. Нужно обязательно проконтролировать правильную идентификацию бурсафеленхов под микроскопом, что очень непросто.

Поэтому обычно лучше вначале попытаться размножить неселектированную культуру (первым методом), а затем на размноженном материале произвести чистку культуры нематод (вторым методом), разделив размножившиеся виды (обычно их не более двух, вид р. *Bursaphelenchus* и вид другого микотрофа – р. *Aphelenchoides* или *Paraphelenchus*). Размноженные культуры можно использовать для приготовления коллекционных препаратов (для идентификации вида), молекулярно-генетических исследований и опытов по проверке их вредоносности (тесты на патогенность).

Заражение культур гриба серой гнили *B. cinerea* дауер личинками стволовых нематод, выделенными из жуков и их личинок. Поступают аналогичным образом, как и с инокуляцией нематодами, полученными из древесины. Сначала вскрывают предварительно дважды омытое дистиллированной водой насекомое (имаго или личинку) скальпелем в капле физиологического раствора в пластиковой чашке Петри, просматривают под бинокуляром на наличие нематод, а в случае обнаружения последних – пипеткой со сменным стерильным наконечником переносят всю суспензию (тело насекомого и личинки нематод) в центр чашки Петри с культурой гриба *B. cinerea*. Если тело содержало дауеров микотрофных фитонематод, то через 1–4 недели происходит их размножение, причем развиваются пропативные микотрофные поколения этих нематод, состоящие из самцов и самок. Культуру чистят, как и в случае размножения культур из древесины: выбирают 20–25 половозрелых особей из исходной культуры, помещают их в каплю дистиллированной воды, контролируют под микроскопом принадлежность к одному виду и переносят каплю пипеткой со сменным стерильным наконечником в новую чистую культуру гриба *B. cinerea*.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках темы Зоологического института РАН «Разнообразие паразитарных систем и адаптаций паразитических червей», раздел «Изучение фитонематод».

Библиографический список

Аномальная жара в России (2010). URL: <https://ru.wikipedia.org/?oldid=68912367> (дата обращения: 18.03.2015).

Society of Nematologists. URL: <http://www.nematologists.org/> (дата обращения: 18.03.2015).

Bibliography

Anomalaja zhara v Rossii (2010). URL: <https://ru.wikipedia.org/?oldid=68912367> (data obrashcheniia: 18.03.2015). (Rus)

Society of Nematologists. <http://www.nematologists.org/> (data obrashcheniia: 18.03.2015). (Rus)

Рысс А.Ю. Самые простые методы обнаружения стволовых нематод и их лабораторного культивирования // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2015. Вып. 211. С. 287–295.

Описаны оригинальные простые и эффективные методы обнаружения и экстракции стволовых нематод в лесонасаждения и парках, а также методика культивирования микотрофных фитогельминтов. Статья предназначена для лесопатологов, студентов и преподавателей биологии и лесотехнических дисциплин, имеющих ограниченные технические возможности.

Ключевые слова: стволовые нематоды, методики для начинающих, симптомы нематодной инфекции, экстракция нематод, культивирование нематод.

Ryss A.Yu. The most simple techniques for detection and laboratory cultivation of woody plant wilt nematodes. *Izvestia Sankt-Peterburgskoj Lesotehnicoskoj Akademii*, 2015, is. 211, pp. 287–295 (in Russian with English summary).

Simple and original techniques for detection and laboratory cultivation of woody plant wilt nematodes are described. The paper is aimed to forest pathologists as well as biology and forestry teachers and students with limited access to equipment facilities.

Keywords: woody plant wilt nematodes, techniques for beginners, nematode infection symptoms, nematode extraction, nematode culturing.

РЫСС Александр Юрьевич – главный научный сотрудник Зоологического института РАН, доктор биологических наук.

199034, Университетская наб., д. 1, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: nema@zin.ru

RYSS Alexander Yu. – DSc (Zoology), principal scientific researcher, Zoological Institute, Russian Academy of Science.

199034. Universitetskaya nab. 1. St. Petersburg. Russia. E-mail: nema@zin.ru